Zur Kenntnis der roten Täublingsfarbstoffe (Russupteridin-s$_{III}$)

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt
der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich

von
THOMAS J. VENAKIS
aus Zouridi (Kreta), Griechenland

Begutachtet von Herrn Prof. Dr. Conrad Hans Eugster

Juris Druck + Verlag Zürich
1978

1979

Zur Kenntnis der roten Täublingsfarbstoffe (Russupteridin-s$_{III}$)

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung der philosophischen Doktorwürde

vorgelegt
der Philosophischen Fakultät II der Universität Zürich

von
THOMAS J. VENAKIS
aus Zouridi (Kreta), Griechenland

Begutachtet von Herrn Prof. Dr. Conrad Hans Eugster

Juris Druck + Verlag Zürich
1978

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

ISBN 3 260 04687 9

Meinen lieben Eltern

Für die grosszügige Unterstützung und die ständige fachliche Förderung möchte ich meinem verehrten Lehrer

Herrn Prof. Dr. Conrad Hans Eugster

unter dessen Leitung die vorliegende Arbeit entstanden ist, an dieser Stelle herzlich danken.

INHALTSVERZEICHNIS

I	EINLEITUNG		4
II	BISHERIGE ARBEITEN ÜBER DIE RUSSULA-FARBSTOFFE (TÄUBLINGSFARBSTOFFE)		5
III	EIGENE ARBEITEN		15
	1.	Aufarbeitung, Trennung und Isolierung von Russupteridin-s_{III} (RP-s_{III})	15
	2.	Untersuchungen an RP-s_{III}	16
	2.1.	Acetylierung	16
	2.1.a.	Acetylierung von RP-s_{III} mit Essigsäureanhydrid in Pyridin und Dimethylformamid	16
	2.1.b.	Acetylierung von RP-s_{III} mit Essigsäureanhydrid und Natriumacetat	24
	2.2.	para-Brombenzoylierung von RP-s_{III}	25
	2.3.	Ribose-Bestimmung	27
	2.3.4.	Ribose-Nachweis an den roten Russupteridinen	27
	2.3.b.	Ribose-Bestimmung - Allgemeiner Ueberblick	29
	2.3.c.	Quantitative Ribose-Bestimmung mit der Orcin-Methode	35
	2.3.d.	Zum Aequivalent- und Molekulargewicht von RP-s_{III}	41

2.3.e. Ribose-Nachweis mit der Cystein-hydrochlorid-Methode - Aglykon von RP-s_{III} 41
2.4. Druckhydrolyse von RP-s_{III} 47
2.5. Oxydativer Abbau von RP-s_{III} 53
2.5.a. Ozonabbau 54
2.5.b. Kaliumpermanganat-Oxydation an RP-s_{III}; Isolierung der Abbauprodukte $MnOxg_a$, $MnOxg_b$ und $MnOx_3$ 56
2.6. ^{13}C-NMR.-Spektren von RP-s_{III} und $MnOx_3$ 71
2.7. Metallkomplexe von RP-s_{III} 80
3. Zusammenfassung 81
4. Verdankungen 82

IV EXPERIMENTELLER TEIL 83

1. Allgemeines 83
2. Weitere Reinigung des Pilz-Extraktes von RP-s_{III} 85
3. Acetylierung von RP-s_{III} 86
4. para-Brombenzoylierung von RP-s_{III} 88
5. Ribose-Bestimmung 88
6. Bearbeitung von RP-s_{III} mit H_2SO_4 90
7. Druckhydrolyse von RP-s_{III} 91
8. Ozonolyse 101
9. $KMnO_4$-Oxydation 103
10. Untersuchungen, ob durch die AcOH-Druckhydrolyse von $MnOxg_a$, $MnOxg_b$ und $MnOx_3$ die Verbindungen 1, 2 und 3 entstehen 113

11. Untersuchungen, ob nach der $KMnO_4$-Oxydation von RP-s_{III} und nach der AcOH-Druckhydrolyse der Oxydationsprodukte V-Compound (2) entsteht 113

12. Metallkomplexe von RP-s_{III} 115

V LITERATURVERZEICHNIS 116

I EINLEITUNG

Die Trennung, Isolierung und Versuche zur Strukturaufklärung des roten Hauptfarbstoffes (Russupteridin-s_{III}) aus Täublingsarten (*Russula sardonia* bzw. *Russula emetica*) bilden das Thema der vorliegenden Arbeit. Die Tatsache, dass es sich um das erste bisher in der Natur gefundene Pteridin-N-Ribosid handelt, macht diesen Farbstoff äusserst interessant. Das Vorkommen des Riboflavins in vielen Russula-Arten, die Isolierung von weiteren Inhaltsstoffen und die Gewinnung von Abbau-Produkten aus Russupteridin-s_{III}, die dem Riboflavin strukturell ähnlich sind, führen zum Schluss, dass ein Zusammenhang zwischen der Biogenese von Riboflavin und der Russupteridine besteht.

Mit der vorliegenden Arbeit wurde versucht, einen weiteren Beitrag zu den bisherigen Erkenntnissen über die Russula-Farbstoffe zu leisten. Sie ist eine Fortsetzung der Dissertationen von Frauenfelder (1) und Iten (2) und weiterer Veröffentlichungen aus der Arbeitsgruppe von Prof. C.H. Eugster (3-10).

II BISHERIGE ARBEITEN ÜBER DIE RUSSULAFARBSTOFFE (TÄUBLINGSFARBSTOFFE)

Ueber die morphologischen, biochemischen und chemischen Probleme von Pilzen und ihren Inhaltsstoffen der Gattung Russula (Täublinge), Familie Russulaceae, Ordnung Agaricales, Klasse Basidiomycetes, wurden bis heute verschiedene Arbeiten durchgeführt (1-18).

Die Gattung Russula umfasst nach (11) 395 Arten, wovon 180 in Europa und Nordafrika vorkommen (12). Die Untersuchung der Inhaltsstoffe der Täublinge ist bedeutungsvoll, weil sie wertvolle Substanzen, wie z.B. Proteine, Vitamine und Antibiotika, enthalten. Viele der typischen Russula-Inhaltsstoffe sind aber noch wenig erforscht.

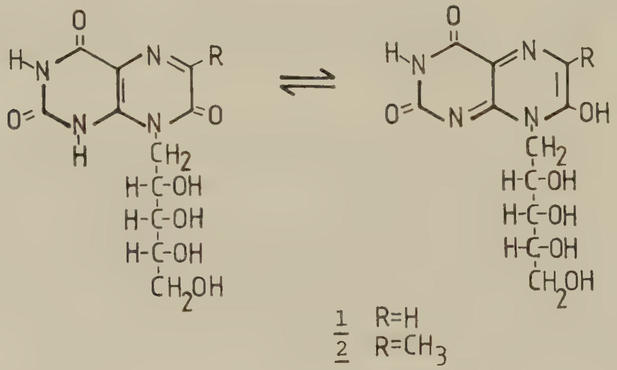
Die Farbstoffe, welche die reiche Färbung der Täublinge hervorrufen (helles Gelb, Orange, Rot, Violett, Blau und Grün bis zu Grauschwarz) befinden sich in der oberen Huthaut. Zudem enthält das Fruchtfleisch der meisten Russula-Arten sehr charakteristische farblose, im UV-Licht stark violettblau oder gelbgrün fluoreszierende Stoffe. Von einigen der fluoreszierenden Stoffe weiss man heute, dass es sich um Lumazine bzw. Lumazin-Vorstufen handelt. In diesem Fall wird allgemein von Russupteridinen (= RP) gesprochen (6).

Die Extraktion der farblosen und der meisten gelben Russupteridine ist ziemlich einfach. Schwieriger jedoch ist ihre Reindarstellung. Grössere Extraktions- und Trennprobleme treten bei den roten und blauen sowie bei einigen gelben Farbstoffen auf. Diese lassen sich aus dem Pilzgewebe nur

langsam und oft nur unvollständig extrahieren, obwohl es sich um relativ gut wasserlösliche Stoffe handelt.

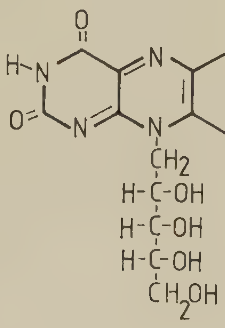
Die Reingewinnung der roten Russula-Farbstoffe ist mit besonders grossen Schwierigkeiten verbunden (3-6).

Von den zahlreichen (bisher sind ca. 14 chromatographisch nachgewiesen) farblosen, im UV.-Licht violett fluoreszierenden Russupteridinen wurden bisher zwei isoliert und identifiziert, nämlich 7-Oxo-8-ribityl-7,8-dihydro-lumazin (1) aus R.emetica und 6-Methyl-7-oxo-8-ribityl-7,8-dihydro-lumazin (2, sog. V-Compound) aus R.sardonia, R.emetica und anderen gemischten roten Russula-Arten (5,6).



Watson (13) fand in 26 Russula-Arten mit Hilfe der Dünnschichtchromatographie insgesamt 7 verschiedene gelbe Zonen. Wenige Jahre später wurden von Gluchoff (14) in etwa 40 Russula-Arten mittels Papier- und Dünnschichtchromatographie wiederum 7 gelbe Farbstoffe qualitativ nachgewiesen. Von der Arbeitsgruppe Eugster (1, 5-9) wurden bis heute 5 gelbe Russupteridine isoliert, wovon 3 strukturell aufgeklärt wurden. Koch (8,6) isolierte und kristallisierte drei gelbe Farbstoffe aus

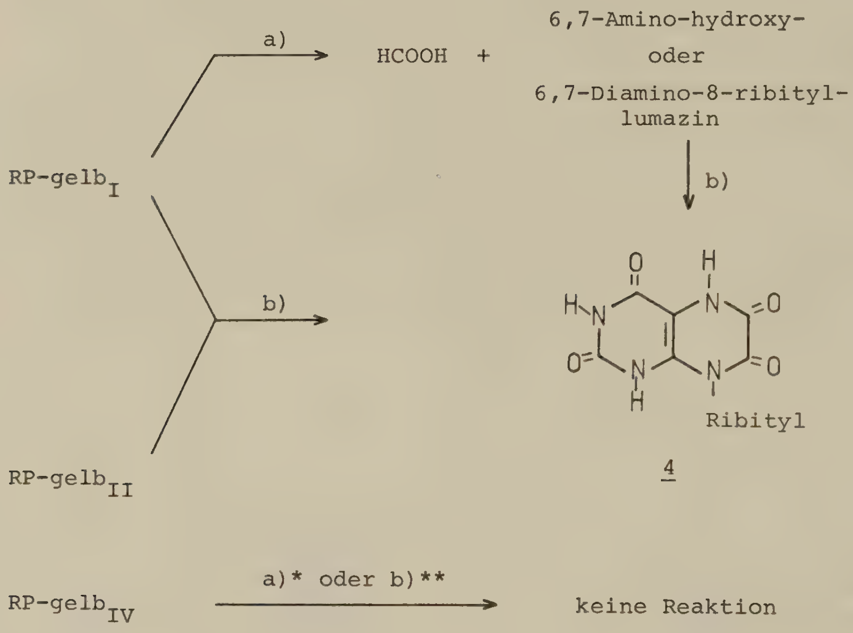
R.obscura, R.paludosa und R.sardonia. Er bezeichnete sie mit RP-gelb$_I$, RP-gelb$_{II}$ und RP-gelb$_{III}$. Seine Untersuchungen haben gezeigt, dass es sich beim RP-gelb$_{III}$ um Riboflavin (3) handelt, welches in zahlreichen Russula-Arten in relativ grossen Mengen enthalten ist (über den Riboflavingehalt einiger Russula-Arten siehe 5).



3

Die von Iten (6,7) durchgeführte Bombenrohr-Hydrolyse von RP-gelb$_I$ und RP-gelb$_{II}$ in 2proz. Essigsäure unter Sauerstoffausschluss während 1,5 Std. bei 150° ergab 6,7-Dioxo-8-ribityl-5,6,7,8-tetrahydrolumazin (4), Schema 1. Die Hydrolyse von RP-gelb$_I$ in 0,1N HCl oder 0,1N NaOH bei Z.T. ergab Ameisensäure sowie ein Zwischenprodukt, dessen Chromophor dem von 6,7-Amino-hydroxy- bzw. 6,7-Diamino-8-ribityllumazin ähnlich sein könnte. Die weitere Hydrolyse dieses Produktes in 2proz. Essigsäure im Bombenrohr ergab wiederum die Verbindung 4.

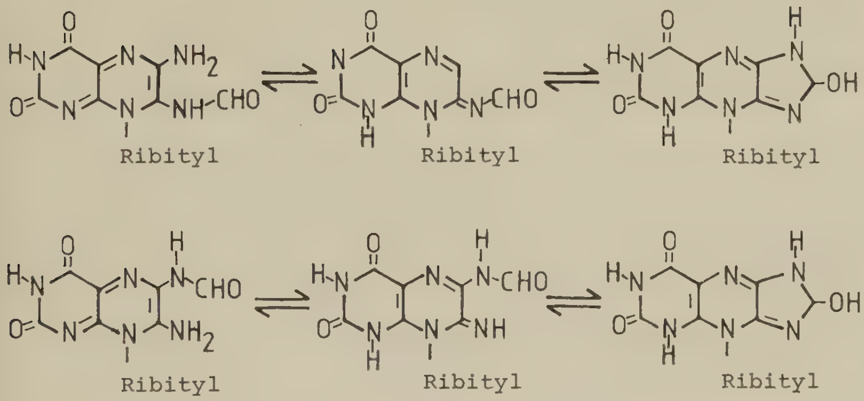
<u>Schema 1:</u> Saure Hydrolyse von RP-gelb$_{I/II}$ und IV



a) 0,1N HCl oder 0,1N NaOH Z.T. (* Rückfluss)
b) 2proz. AcOH Bombenrohr 150^{o} 1,5 Std. (** 5 Tage)

Auf Grund dieser Ergebnisse und der UV.-, CD-, ^{1}H-NMR.- und ^{13}C-NMR.-Spektren sowie der Umwandlung von RP-gelb$_{I}$ zum RP-gelb$_{IV}$ (dessen Struktur gesichert ist) durch Oxydation mit Silberoxid in NaOH-Lösung (Schema 3) schlagen Iten, H.Märki-Danzig und Eugster (6,7) die nachstehenden isomeren Strukturen (5, 6-Amino-7-formamido-8-ribityl-lumazin resp. 6-Formamido-7-amino-8-ribityl-lumazin) für RP-gelb$_{I}$ vor :

Schema 2: Die beiden Isomere von RP-gelb$_I$ und einige ihrer tautomeren Formen.

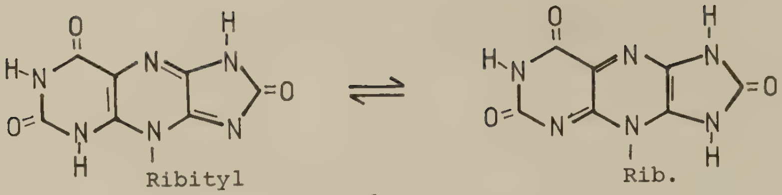


5

Die Struktur von RP-gelb$_{II}$ ist noch nicht gesichert; Eigenschaften siehe (6).

Aus *R. sardonia* wurde ferner eine weitere gelbe, intensiv blau-violett fluoreszierende Verbindung, das sog. RP-gelb$_{IV}$, mit einer Ausbeute von 25 mg aus 300 kg frischen Fruchtkörpern isoliert (6,7,9). Sie ist äusserst stabil bei saurer Hydrolyse (Schema 1).

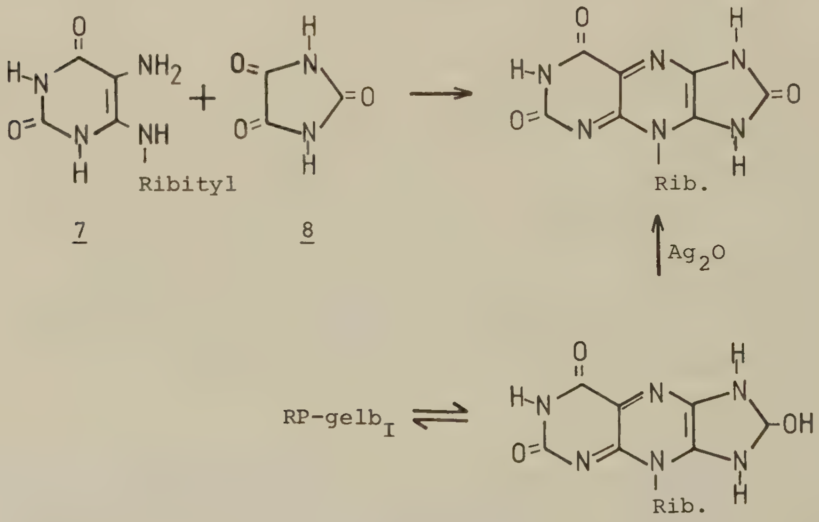
Auf Grund spektroskopischer Daten wurde von H.Märki-Danzig und Eugster (6,7,9) die Struktur 6 (4-Ribityl-imidazolo[4,5-g] pteridin-2,6,8(1H,4H,5H,7H)-trion für RP-gelb$_{IV}$ vorgeschlagen :



6

Diese Struktur ist nach Synthese durch Kondensation von 4-Ribityl-amino-5-amino-uracil (7) mit Parabansäure (8) in Aethylenglycol mit para-Toluolsulfonsäure als Katalysator gesichert (Schema 3).

Schema 3: Synthese von RP-gelb$_{IV}$
Oxydation von RP-gelb$_{I}$



Vor kurzem wurde aus R.ochroleuca eine neue, gelbe Verbindung, das sog. RP-gelb$_{V}$, in kleinen Mengen isoliert (7). Ueber die Chemie dieses Farbstoffes ist bisher noch wenig bekannt.

Von den roten Russula-Farbstoffen (bisher wurden ca. 5 chromatographisch nachgewiesen) wurde die Hauptkomponente, das sog. Russupteridin-s_{III}, schon mehrfach untersucht (1-6, 10). Dieser Farbstoff überwiegt in R.sardonia und R.emetica sowie bei verschiedenen anderen roten Russula-Arten. Man erhält etwa 930 mg aus 150 kg frischen Fruchtkörpern von R.obscura bzw. 200 mg aus 32 kg R.paludosa bzw. 250 mg aus 38 kg R.emetica (3).

Der reine Farbstoff Russupteridin-s_{III} ist ein schwarzrotes, amorphes Pulver mit Metallglanz. Weder er selbst noch eines der anderen roten Russupteridine konnten bis heute kristallisiert werden. Diese Tatsache stellt die Reinheit des zu untersuchenden Farbstoffes Russupteridin-s_{III} in Frage, obwohl er sich in mindestens 40 verschiedenen Adsorbentien- und Lösungsmittelsystemen einheitlich zeigte. Er ist gut wasserlöslich, schwer löslich in polaren Lösungsmitteln (Dimethylformamid, Pyridin) und unlöslich in den üblichen organischen Lösungsmitteln. Er zeigt einen Schmelzpunkt von mehr als 300^{o} und ist nicht flüchtig. Er ist lichtempfindlich und sehr alkalilabil, relativ stabil in verdünnten schwachen Säuren mit einem Stabilitätsmaximum bei pH 5 (1-4).

Die Kombination der Elementaranalysen von RP-s_{III} aus (1) und (2) ergibt : C 40,5 - 42,7 % H 5,3 - 5,9 % N 17,6 - 21,9 %. Die Elektrophorese zeigte, dass Russupteridin-s_{III} basische Gruppen besitzt.

Wegen der ausgeprägten Alkalilabilität von RP-s_{III} wurden von Iten (2,4) die Abbauversuche (Hydrolysen) in saurem Milieu durchgeführt.

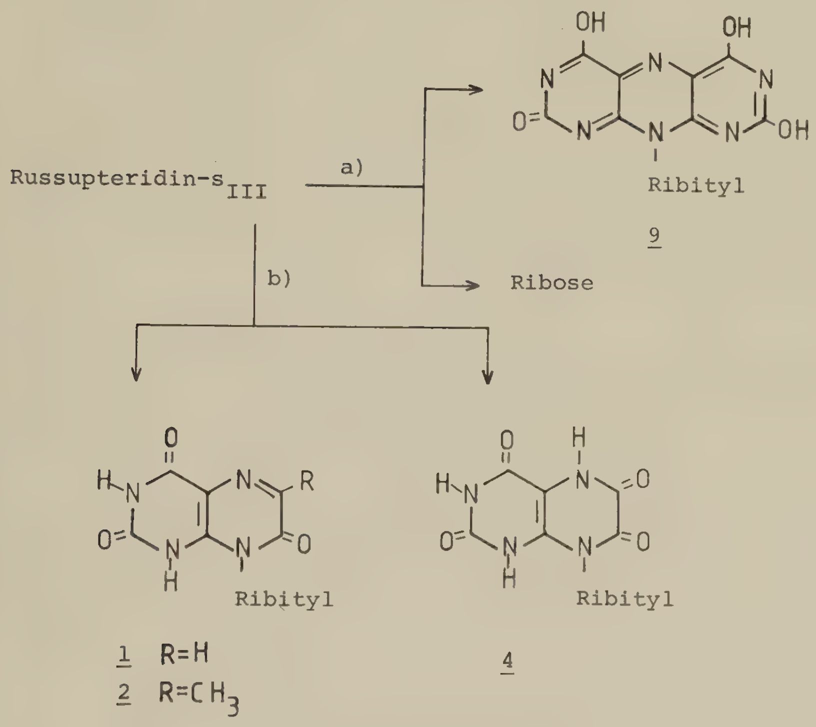
Unter Rückflusskochen von RP-s_{III} in 1N HCl während 45 Min. ohne Luftausschluss entsteht eine hellgelbe, im UV stark hellblau fluoreszierende Lösung, die nach chromatographischer und elektrophoretischer Trennung eine kristalline Verbindung ergibt. Es handelt sich um 2,10-Dihydro-4,6,8-trihydroxy-10-ribityl-2-oxo-pyrimido[5,4-g]pteridin (9), wie durch Vergleich mit einer nach Davoll und Evans (19) hergestellten Probe bestätigt wurde. Ausser Ribose konnte keines der anderen Hydrolyse-Produkte identifiziert werden. Die Isolierung und Identifizierung dieser Verbindung beweist erstmals, dass in RP-s_{III} eine N-Ribitylgruppe vorhanden ist.

Weitere Hydrolyse-Versuche von RP-s_{III} wurden von Iten (2,4) in 2proz. AcOH unter Sauerstoffausschluss im Bombenrohr während 2 Std. bei 150^{o} durchgeführt. Von den zahlreichen farblosen, im UV fluoreszierenden Produkten konnten nach der Isolierung durch spektroskopische und chromatographische Methoden folgende Verbindungen identifiziert werden: 6-Methyl-7-oxo-8-ribityl-7,8-dihydrolumazin (2, die sog. V-Compound von Masuda (20)), 7-Oxo-8-ribityl-7,8-dihydrolumazin (1) und 6,7-Dioxo-8-ribityl-5,6,7,8-tetrahydrolumazin (4).

Die Verbindung 2 ist offensichtlich ein Seitenprodukt der Riboflavinbiogenese und lässt einen möglichen Zusammenhang mit jener von Russupteridin-s_{III} vermuten.

Die bisher bekannten Abbauprodukte von RP-s_{III} und die Aehnlichkeit seines Elektronenspektrums mit jenem von Rhodopterin (21) und seinen Homologen sowie mit jenem von Drosopterinen (22) beweisen seinen Pteridincharakter. Nach Iten, Arihara und Eugster (2,4) sollte es sich um ein dimeres Lumazin handeln, dessen eine Molekülhälfte die Verbindung 2 darstellt.

Schema 4: Saure Hydrolyseprodukte von Russupteridin-s_{III} nach (2,4).



a) 1N HCl, 45 Min. Rückfluss

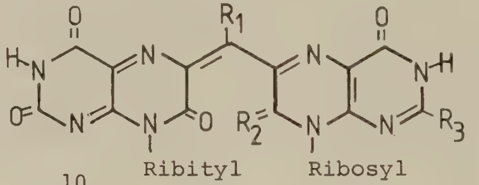
b) 2proz. Essigsäure im Bombenrohr unter Sauerstoffausschluss (150°, 2,5 Std.)

Ihre C(6)-Methylgruppe bildet die Verknüpfungsstelle der beiden Hälften. Die erwähnten Autoren konnten unter den Produkten der Essigsäure-Hydrolyse 4 - 5 strukturell nicht identifizierte, mit dem gleichen Chromophor wie 1 und 2 dunkelblau fluoreszierende Ribosylverbindungen nachweisen. Auf Grund dieser Tatsache nahmen die Autoren an, dass auch die zweite Molekülhälfte ein Pteridin (Lumazin oder Pterin) mit einem Ribosylrest sein sollte. Wegen des basischen Charakters von RP-s_{III} und der Tatsache, dass die Lumazinderivate 1 und 2 sauer sind, muss die unbekannte Molekülhälfte entweder eine basische Funktion haben, oder aber die sauren Gruppen sind bei der Hydrolyse entstanden.

Auf Grund aller bisherigen Ergebnisse schlagen die Autoren nachstehende Teilstruktur für Russupteridin-s_{III} vor:

Schema 5: Strukturmöglichkeiten von RP-s_{III} nach (2,4).

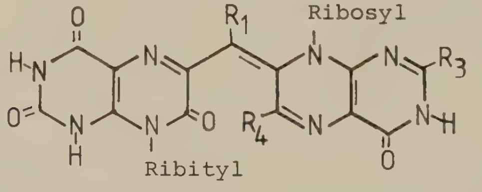
6,6'-Verknüpfung



10

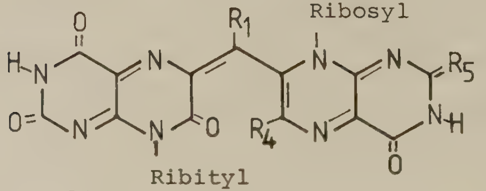
R_1 = H?
R_2 = O, H_2
R_3 = OH, NH_2

6,7'-Verknüpfung



11

R_3 = OH, NH_2
R_4 = OH, H



12

R_4 = OH, H
R_5 = O, NH

III EIGENE ARBEITEN

1. AUFARBEITUNG, TRENNUNG UND ISOLIERUNG VON RUSSUPTERIDIN-s_{III}

Die Isolierung von Russupteridin-s_{III} wurde nach (4) durchgeführt. Der aus 165 kg Pilzen erhaltene Extrakt wurde durch Chromatographie an grossen Cellulose- und Sephadex G-25 Säule solange gereinigt, bis er keine blau fluoreszierenden Stoffe mehr enthielt. Dann wurde der Farbstoff aus wässriger Lösung mit Methanol ausgefällt und bei 0,001 Torr 80° während 12 Std. getrocknet.

Der Vergleich des von Iten (4) aus R.emetica mit dem von mir aus R.sardonia isolierten RP-s_{III} zeigt (siehe Tabelle 1), dass die beiden Präparate als identisch betrachtet werden dürfen, dass sie jedoch auf Grund der UV/VIS.-Spektren nicht denselben Reinheitsgrad aufweisen.

Tabelle 1:

R_f-Werte der beiden Präparate

0,60	DC Cellulose	in 16proz. Pyridin
0,46	DC Cellulose	in 20proz. Essigsäure
0,31	DC CM-Cellulose	in H_2O/Pyridin 18:1

UV/VIS.-Spektren-Vergleich

RP-s_{III} aus:

R.emetica pH 1,01 (0,1M HCl/NaCl), $c = 0{,}647 \cdot 10^{-3}$ %; λ_{max} in nm ($E^{\%}_{cm}$):
288(209), 390(142), 410(133), [497], 523(644).

pH 9,22 (2proz. Na_2HPO_4), $c = 0{,}657 \cdot 10^{-3}$ % :
268(216), 391(128), [411(940)], 509(415), 541(519).

R.sardonia pH 1,1 (0,1N HCl), $c = 1{,}62 \cdot 10^{-3}$ % :
290(274), 390(205), 410(200), [495(754)], 523(923).

pH 9,22 (2proz. Na_2HPO_4), $c = 0{,}9 \cdot 10^{-3}$ % :
268(0,419), 391(0,290), [414(0,240)], 508(0,980), 541(0,960).

2. UNTERSUCHUNGEN AN RUSSUPTERIDIN-s_{III}

2.1. ACETYLIERUNG

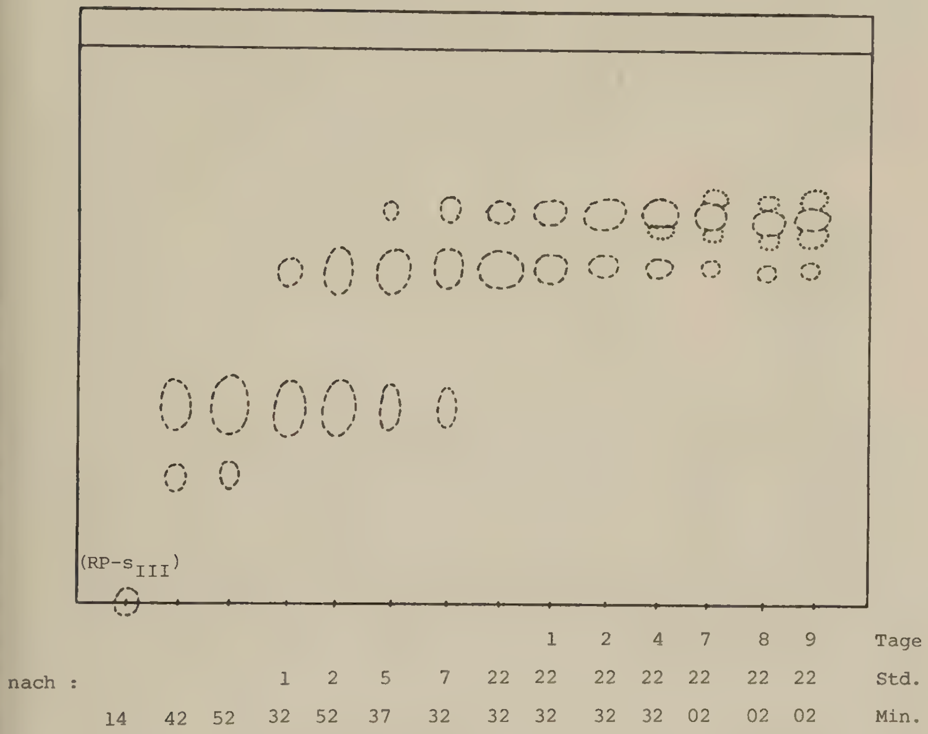
Die hohe Wasserlöslichkeit von Russupteridin-s_{III} und seine Unlöslichkeit in den üblichen organischen Lösungsmitteln (2,3) erschweren die Untersuchungen beträchtlich. Es wurde deshalb zuerst der Versuch gemacht, Derivate herzustellen, die in organischen Lösungsmitteln besser löslich sind, in der Erwartung, damit leichter Schlüsse hinsichtlich der Struktur von RP-s_{III} ziehen zu können.

2.1.a. Acetylierung von Russupteridin-s_{III} mit Essigsäureanhydrid in Pyridin und Dimethylformamid

Frauenfelder (1) erhielt aus Russupteridin-s_{III} nach achttägigem Stehenlassen in Pyridin und Essigsäureanhydrid zwei orange und zwei rote Acetylierungsprodukte. Das orange Hauptprodukt könnte gemäss Spektren einem O- und N-Acetat entsprechen.

Die Verfolgung des Acetylierungsablaufes in Funktion der Zeit (Figur 1) zeigt die Entstehung und die allmähliche, aufeinanderfolgende Umwandlung von insgesamt 6 Produkten (vgl. Exp. 3.1.). Da mit Abbaureaktionen gerechnet werden muss, wurde nur kurzzeitig acetyliert. Dies wurde durch Stehenlassen einer verdünnten Lösung von 5 mg RP-s_{III} in 12,5 ml trockenem Pyridin und in 12,5 ml trockenem Dimethylformamid während 40 Min. bei Z.T. erreicht (vgl. Exp. 3.2.). Die Farbe der Lösung änderte sich dabei nicht. Das DC auf Kieselgel zeigte die Entstehung von drei purpur-roten Produkten mit R_f-Werten 0.20, 0.35 (Hauptprodukt) und 0.62 (R_f von RP-s_{III} gleich 0).

Figur 1: Acetylierung von Russupteridin-s_{III}.[a)]



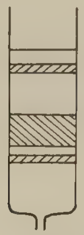
---

a) Essigsäureanhydrid, Pyridin, Dimethylformamid

DC auf MN-Polygram Kieselgel mit $CHCl_3$/MeOH 9:1

Farbe: ----- purpur, ····· gelb

Die gebildeten Produkte wurden durch Säulenchromatographie an Kieselgel (Elutionsmittel: $CHCl_3$/MeOH 20:1) getrennt. Das Hauptprodukt wurde anschliessend durch Umfällen aus $CHCl_3$ mit Pentan weiter gereinigt. Im Gegensatz zum Ausgangsmaterial ist dieses Derivat nun in organischen Lösungsmitteln sehr leicht löslich geworden. Damit können die spektralen Eigenschaften von RP-s_{III} viel besser untersucht werden.

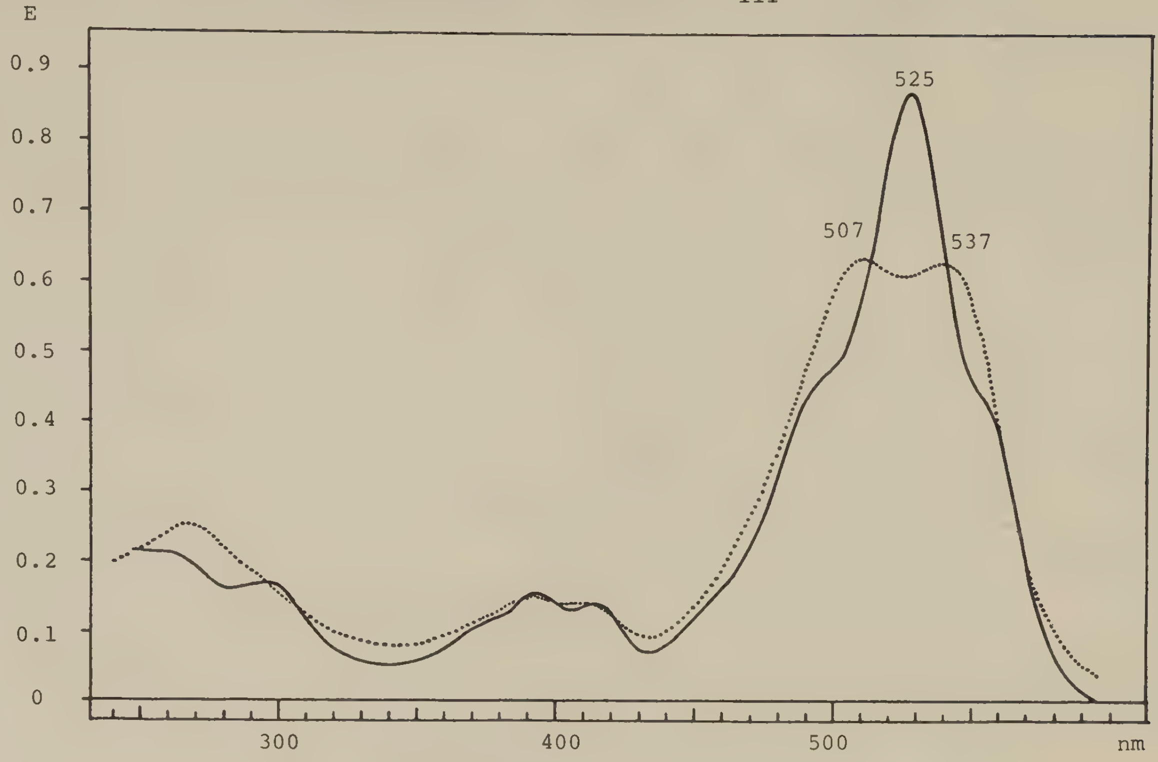


Die UV.-Spektren von RP-s_{III} und seines Acetylierungsproduktes sind in Figur 2 abgebildet. Es darf daraus geschlossen werden, dass das chromophore System von RP-s_{III} unverändert geblieben ist. Das langwellige Doppelmaximum ist durch ein einfaches Maximum ersetzt. Eine Deutung kann vorderhand nicht gegeben werden; möglicherweise liegt ein Einfluss des verwendeten Lösungsmittels vor.

Das IR.-Spektrum des Acetylierungsproduktes, in $CHCl_3$ aufgenommen, und dasjenige von RP-s_{III} in KBr ist in Figur 3 wiedergegeben.

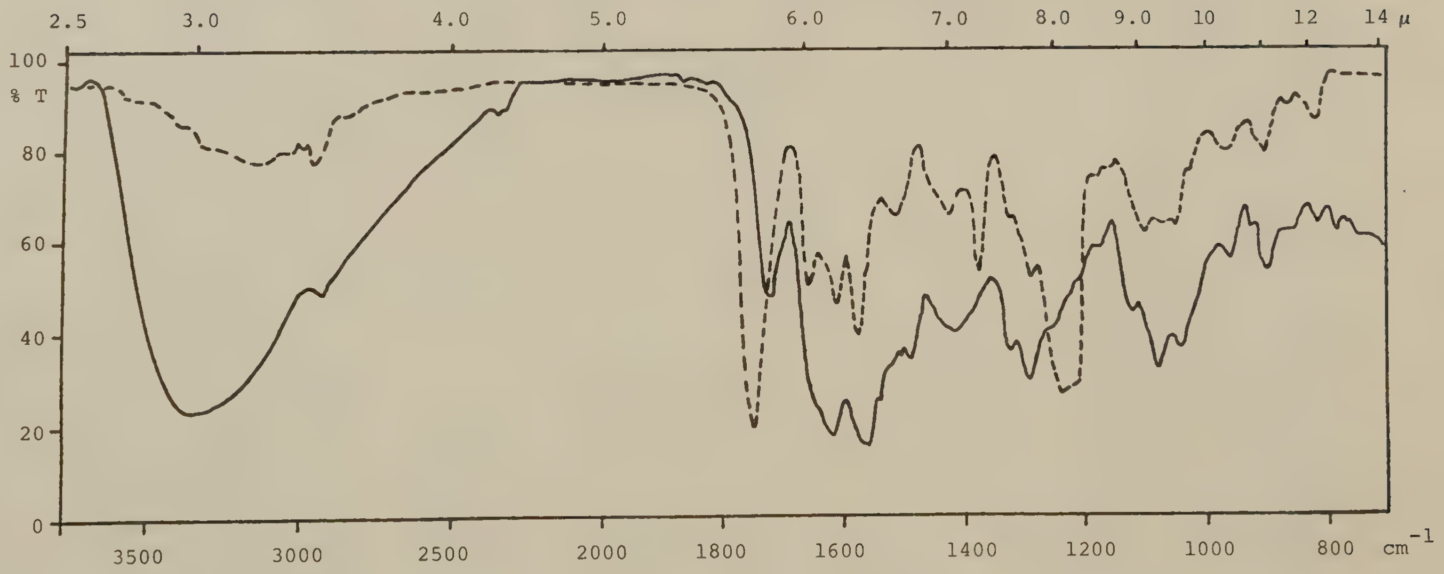
Die durch Valenzschwingungen von OH- und NH-Gruppen hervorgerufene breite und starke Absorption bei 3370 cm^{-1} von RP-s_{III} wird in der Acetylverbindung durch eine schwache, breite Bande bei 3140 cm^{-1} ersetzt, die vermutlich noch nicht oder unvollständig acetylierten OH- und NH-Gruppen entspricht. Die Bande des acetylierten RP-s_{III} bei 2950 cm^{-1}

Figur 2: UV/VIS.-Spektren von Russupteridin-s_{III} ····· a) und acetyliertem Russupteridin-s_{III} ——— b).



a) in H_2O, b) in $CHCl_3$

<u>Figur 3:</u> IR.-Spektren von Russupteridin-s_{III} ——— a)
und acetyliertem Russupteridin-s_{III} ----- b).



---

a) nach (2,4) in KBr
b) in $CHCl_3$

(bzw. von RP-s_{III} bei 2930 cm^{-1}) ist den CH-Valenzschwingungen des Ribityl- und Ribosyl-Restes und diejenige bei 1750 cm^{-1} der Absorption des Estercarbonyls und der 4-Oxo-Gruppe des Pteridins zuzuordnen; vergleiche (2,4,23). Die starken Banden zwischen 1660 und 1565 cm^{-1} in beiden Spektren gehören zum Pteridingerüst des Moleküls; vergleiche (23,24). Bei 1520 cm^{-1} erscheinen die N-H- und bei 1425 cm^{-1} die C-H-Deformationsschwingungen. Im Bereich von 1460 - 1260 cm^{-1} des RP-s_{III}-Spektrums, wo die C-H- und O-H-Deformationsschwingungen auftreten, erscheinen in dem entsprechenden Bereich des Spektrums der Acetylverbindung bei 1425 cm^{-1} wiederum die C-H-Deformationsschwingungen, bei 1375 cm^{-1} die symmetrische Deformationsschwingung des Ester-Methyls und bei 1350 - 1200 cm^{-1}, mit einer breiten und starken Bande, die C-O-Valenzschwingung des Esters, zusammen mit den Deformationsschwingungen der nicht acetylierten Hydroxyle; vergleiche die Angaben in (25). Im Bereich von 1000 - 1150 cm^{-1} des RP-s_{III}-Spektrums erscheint die Absorption der primären (1040 cm^{-1}) und sekundären (1121 cm^{-1}) Hydroxylgruppen, sowie die Valenzschwingungen der entsprechenden C-O-Bindungen des Ribityl- und Ribosyl-Restes (26,27).
Analog absorbieren im Spektrum des acetylierten RP-s_{III} die C-O-C-Valenzschwingungen der Estergruppen des obigen Molekülrestes.
Die Banden im Bereich von 980 - 730 cm^{-1}, 960, 928, 898, 815, 782 cm^{-1} in RP-s_{III}, bzw. bei 970, 904, 865, 820 cm^{-1} in der Acetylverbindung sind nach (28) und (29) charakteristisch für die Ribofuranosyl- oder Ribopyranosyl-Reste. Es ist aber schwierig, Schlüsse hinsichtlich der Natur des Ribosylrestes zu ziehen, weil in diesem Bereich auch Absorptionsbanden der Ribitylgruppe und des Pteridingerüstes erscheinen. Man könnte aber vermuten, dass die vier Banden bei 815 - 970 cm^{-1} durch einen Ribofuranosyl-Rest hervorgerufen werden.

Die Absorption bei 782 cm^{-1} in RP-s_{III} muss einer OH-Gruppe entsprechen, weil sie durch die Acetylierung verschwindet (30).

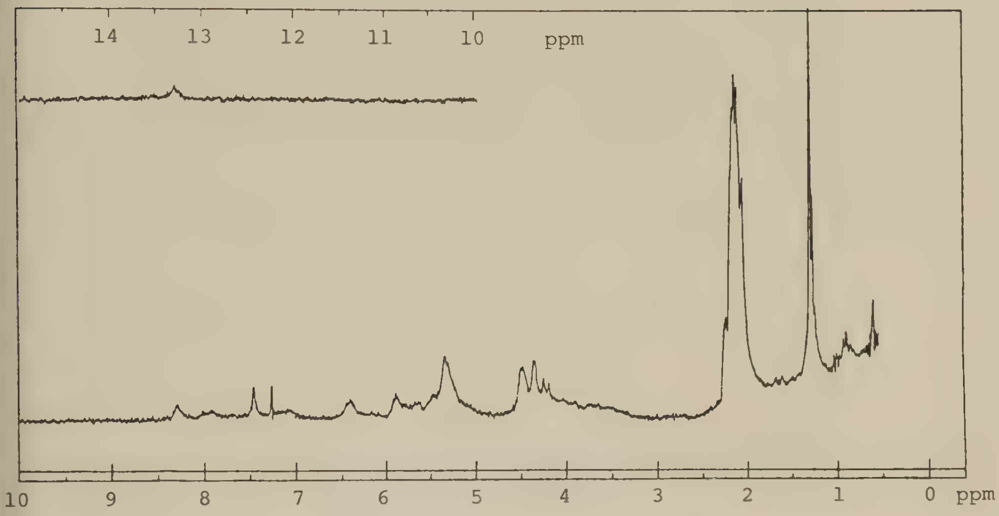
^{1}H-NMR.-Spektren des Acetyl-Derivates von RP-s_{III} ($CDCl_3$), Figur 4, und Vergleich mit RP-s_{III} (d_6-DMSO), Figur 5.

Das ^{1}H-NMR.-Spektrum des acetylierten RP-s_{III} zeigt im Bereich von 2,05 - 2,26 ppm ein Multiplett, das den Methylprotonen der O-Acetyl-Gruppen entspricht.

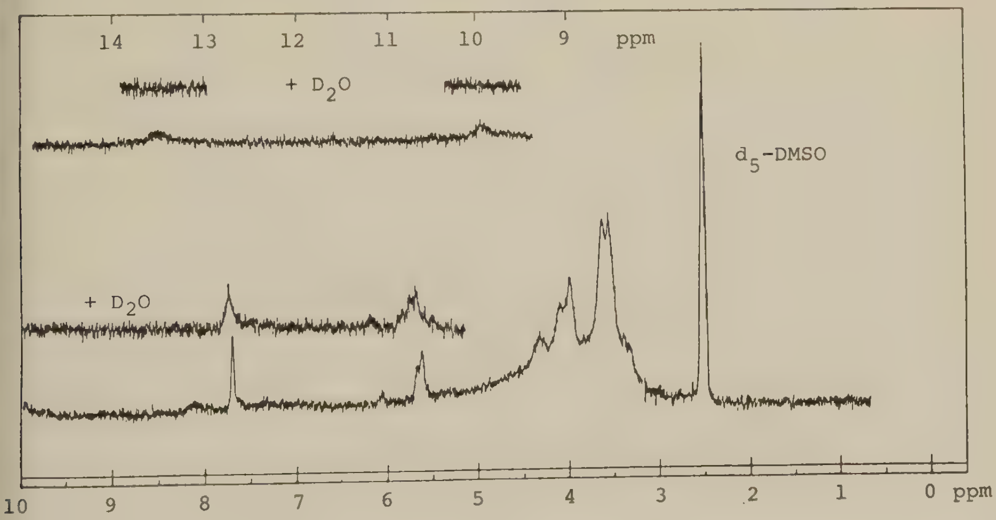
Obwohl DMF und Ac_2O eine N-Acetylierung begünstigen (31), kann eine solche Acetylierung gemäss dem ^{1}H-NMR.-Spektrum ausgeschlossen werden, weil eine N-Acetylgruppe nach (32) um 2,5 ppm erscheinen müsste. Die Methin- und Methylenprotonen und die nicht acetylierten OH-Gruppen des Ribosyl- und Ribityl-Restes erscheinen im Bereich von 3 - 6 ppm. Das Signal bei 5,88 ppm ist dem Anomerproton und jenes bei 6,4 ppm einem Methinproton zuzuschreiben. Die Signale bei 7,09 NH-Proton, 7,46 CH eines Heteroaromaten, 7,92 und 13,3 ppm NH-Proton erscheinen in beiden Spektren.

Bemerkenswert ist die Verschiebung des NH-Protons von 9,95 ppm in RP-s_{III} zu 8,28 ppm in der Acetylverbindung. Dies ist vermutlich zu erklären durch den Wegfall einer H-Brücke zwischen einer NH-Gruppe im Pteridingerüst und einer Hydroxylgruppe im Ribosyl- oder Ribityl-Rest. Man muss aber berücksichtigen, dass ein solcher Effekt auch auf die unterschiedlichen Lösungsmittel zurückgeführt werden könnte.

Figur 4: 100 MHz ^{1}H-NMR.-Spektrum von acetyliertem Russupteridin-s_{III} in $CDCl_3$.



Figur 5: 100 MHz ^{1}H-NMR.-Spektren von Russupteridin-s_{III} in d_6-DMSO und nach Zugabe von D_2O. a)



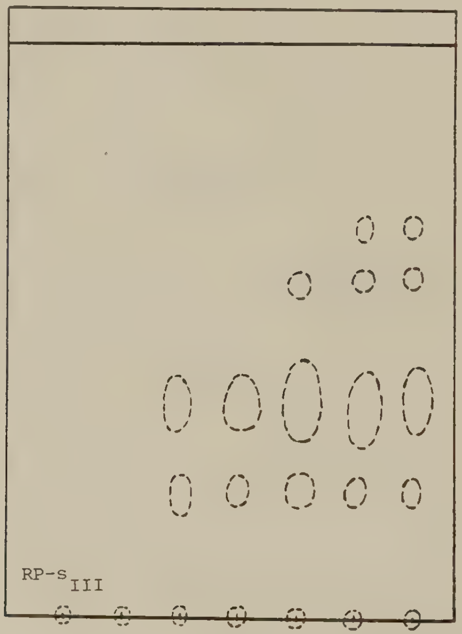
---

a) nach (2,4)

2.1.b. Acetylierung von Russupteridin-s_{III} mit Essigsäureanhydrid und Natriumacetat

Analog zu dem unter 2.1.a. beschriebenen Versuch verläuft die Acetylierung von RP-s_{III} mit Essigsäureanhydrid und Natriumacetat, jedoch viel langsamer. Es wurden die gleichen Produkte erhalten; vergleiche Figur 6.

Figur 6: Acetylierung von Russupteridin-s_{III} [a)]



				1	3	4	Tagen
nach:		2	17	22	17	17		Std.
			30	30	30	30		Min.

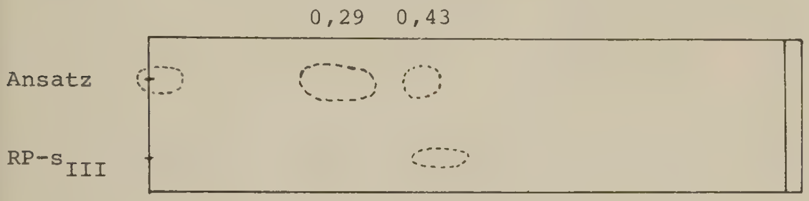
a) Essigsäureanhydrid, Natriumacetat

DC auf MN-Polygram Kieselgel mit $CHCl_3$/MeOH 9:1
Farbe: purpur

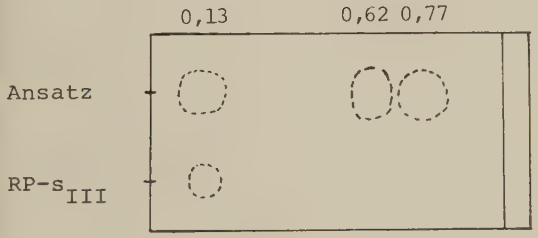
2.2. para-BROMBENZOYLIERUNG VON RUSSUPTERIDIN-s_{III}

Da bis heute weder RP-s_{III} noch ein Derivat davon kristallisiert werden konnte, untersuchte ich die Acylierung mit para-Brombenzoylchlorid in Pyridin. DC der gebildeten Produkte auf Cellulose siehe Figur 7.

Figur 7: DC der para-Brombenzoylierung von RP-s_{III}.



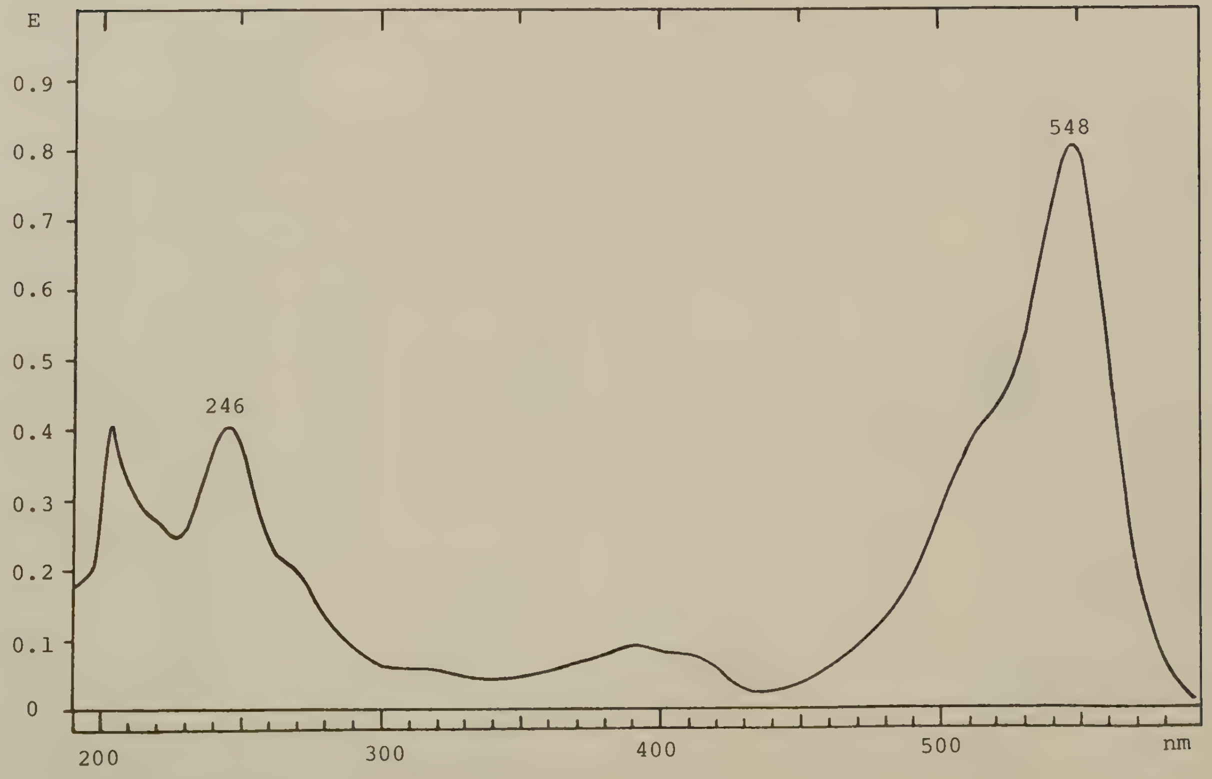
LM : H_2O/Py 9:1



LM : B/A/W 10:3:5

Nach der Aufarbeitung erhielt ich das tiefrote Hauptprodukt (R_f 0,29 DC H_2O/Pyridin 9:1 bzw. 0,62 DC B/A/W 10:3:5), das in Wasser unlöslich, in Aceton und MeOH wenig, sehr gut löslich aber in Pyridin mit einer intensiven violett-roten Farbe ist. Den Beweis, dass es sich um ein para-Brombenzoyl-Derivat handelt, gibt das in MeOH aufgenommene UV/VIS.-Absorptionsspektrum, das ein für den para-Brombenzoyl-Rest charakteristisches UV.-Absorptionsmaximum bei 246 nm zeigt (siehe Figur 8 und Tabelle 2).

Figur 8: UV/VIS.-Spektrum von para-Brom-benzoyliertem Russupteridin-s_{III}.[a)]



---

a) in Methanol

Tabelle 2: UV/VIS-Spektren von Russupteridin-s_{III} und seiner para-Brombenzoylverbindung.

Substanz		λ_{max}(nm) (E)
para-Brombenzoylverbindung von RP-s_{III}	MeOH	204(0,395), 246(0,398), 272(0,190), 319(0,055), 392(0,087), 416(0,070), 508(0,364), 548(0,797)
RP-s_{III}	H_2O	209(0,390), 265(0,250), 390(0,150), 410(0,140), 507(0,635), 537(0,628)
		λ_{min}(nm) (E)
para-Brombenzoylverbindung von RP-s_{III}	MeOH	228(0,240), 342(0,040), 436(0,018)
RP-s_{III}	H_2O	233(0,194), 340(0,080), 402(0,139), 432(0,093), 522(0,608)

2.3. RIBOSE-BESTIMMUNG

2.3.a. Ribose-Nachweis an den roten Russupteridinen

Qualitativ

Im Jahre 1955 versuchten Balenović et al. (18), im Salzsäurehydrolysat des aus *R.emetica* isolierten roten Farbstoffes, den sie Russularhodin nannten, Zucker nachzuweisen. Die Untersuchung war jedoch negativ. Vierzehn Jahre später haben erstmals Frauenfelder und Eugster (1,3) sowie Gluchoff und

Lebreton (14,15) unabhängig voneinander gezeigt, dass die roten Russupteridine Glykoside sind. Durch Papierchromatographie des sauren Hydrolysates des aus einem Gemisch von R.badia, R.emetica und R.lepida hergestellten "Russularhodins" konnte Gluchoff Ribose qualitativ nachweisen.

Auf Grund von massenspektrometrischen Daten glaubten die genannten Autoren, Ribose bzw. eine Hexose (Glukose) aus dem Acetylderivat des obigen "Russularhodins" bzw. einer aus R.badia stammenden Probe festgestellt zu haben.

Von Eugster und Mitarbeitern (3,4,10) wurde der rote Hauptfarbstoff Russupteridin-s_{III} aus R.emetica, R.sardonia und anderen Spezies in verdünnter Salzsäure hydrolysiert, das Hydrolysat von den störenden fluoreszierenden Produkten getrennt und der qualitative Zuckernachweis mit Papier- und Dünnschichtchromatographie, Isolierung in Substanz sowie durch Silylierung der Hydrolyseprodukte und anschliessende Gaschromatographie an einer Kapillarkolonne durchgeführt. Ausser Ribose konnten keine anderen Zucker nachgewiesen werden. Ribose konnte später von Rieker (10) auch in einem Hydrolysat von RP-s_{II} sowie in dieser Arbeit in RP-s_{IV} nachgewiesen werden.

Quantitativ

Die quantitative Ribosebestimmung von RP-s_{III} durch energische Hydrolyse mit 12proz. HCl, Destillation und Kolorimetrie des gebildeten Furfurols wurde von Iten (2,4) nach (33) durchgeführt. Die Anwendung dieser Methode an den Modellsubstanzen Adenosin und Inosin ergab je 67 % und an der Ribose selbst 81 % des theoretischen Wertes an Furfurol. Gemäss diesem Verfahren wurde ein Molekulargewicht für RP-s_{III} von

ca. 550 berechnet. Auf Grund des Vorhandenseins einer Ribitylgruppe in RP-s_{III} und der dimeren Natur dieser Verbindung schliessen Eugster, Iten und Arihara (4), dass sie nur <u>einen</u> Ribosyl-Rest enthält. Iten war es nicht möglich, durch Hydrolyseversuche festzustellen, ob eine O- oder eine N-Ribosylverbindung vorliegt. (Neue Ergebnisse mit ^{13}C-NMR.-Spektren siehe Abschnitt 2.6 dieser Arbeit).

Die Bedeutung der Ribosebestimmung für die Strukturermittlung von Russupteridin-s_{III} führte zur Suche nach einem anderen, genaueren und weniger komplizierten Verfahren.

2.3.b. Ribose-Bestimmung - Allgemeiner Ueberblick

Methoden für die Bestimmung der Pentosen - freier oder gebundener - sind für die chemische und biochemische Forschung von grosser Bedeutung.

Neben den Methoden für den qualitativen Nachweis (34b, c, o, q, x) gibt es deren viele für die quantitative Bestimmung der Pentosen in Mengen von 5 - 100 µg. Einige dieser Methoden sind in der Tabelle 3 zusammengefasst.

Verwendete kolorimetrische Methoden basieren auf der Reaktion der Pentose mit Orcin, Cystein, Anthron, Phloroglucin oder Resorcin.

Von diesen Farbreaktionen ist die wichtigste die Orcin-Reaktion von Bial (36), die beim Erwärmen von verschiedenen Zuckern und ihren Derivaten mit einer Orcin, Salzsäure und Spuren von Eisen(III)-Chlorid enthaltenden Lösung stattfindet.

<u>Tabelle 3:</u> Ausgewählte Methoden zur Zuckerbestimmung.

Probe	Methode	Qual. (l) resp. Quant. (n)	Bestimmbare Mengen Zucker (µg)	Reagenzien	Erwärmungszeit bei 100° Min.	Lit.
Pentosen und Pentosen-Derivate	Bial (= Orcin)	n	1 - 20	0,1proz. $FeCl_3$ und 1proz. Orcin in konz. HCl	20	34a
Purinnucleoside	"	l		0,008proz. $FeCl_3$ und 0,3proz. Orcin in konz. HCl	5	b
		n	20	0,02proz. $FeCl_3$ in konz. HCl, 10proz. Orcin in Aethanol	20	
Pentosen und Hexosen in Eiweiss, Blut, Apfelsaft	PC	l				c
Freie Pentosen und Pentosen in Nucleotiden	Cystein	n	10 - 50	Konz. H_2SO_4, Cysteinhydrochlorid	10 bei ZT	d
Nucleinsäure	Orcin	n	2 - 20	0,068proz. $CuCl_2$ und 0,2proz. Orcin in konz. HCl	40	e
Pyrimidin-Nucleoside und -Nucleotide	"	n		Hydrazinolyse 0,02proz. $FeCl_3$ in konz. HCl und 10proz. Orcin in Methanol	20	f
Pentosen, Pentosan und RNS	"	n	10 - 50	0,1proz. Orcin in konz. HCl-AcOH (1:3, V/V) 1 M $FeCl_3$ Lösung	30	g

Tabelle 3: Fortsetzung.

Probe	Methode	Qual. (l) resp. Quant. (n)	Bestimmbare Mengen Zucker (µg)	Reagenzien	Erwärmungszeit bei 100° Min.	Lit.
DPN, ATP	Orcin	n		0,05proz. $FeCl_3$ in konz. HCl und 6proz. Orcin in Aethanol	3 bzw. 20	h
Pentosen in Plasma	"	n		0,2proz. $FeCl_3$ und 1proz. Orcin in konz. HCl	20	i
Pentosen und Hexosen	Spektrophotofluorometrisch	n		Resorcin	20 - 30	j
Pentosen, Hexosen und Uronsäuren	UV-Spektrometrie	n	13	Konz. H_2SO_4		k
Glykoproteine	GLC (Hydrolyse, Reduktion, Acetylierung)	n				l
Zucker und Zuckerderivate von Glykoproteinen	PC	n		TTC		m
Mono- und Oligosaccharide	Gelchromatographie	n	10 - 100	Polyacrylamid Gel, 0,1proz. Orcin in konz. H_2SO_4		n
Glykoproteide	UV-Spektrometrie, GC	l,n		Anthron, Silylierung		o

Probe	Methode	Qual. (l) resp. Quant. (n)	Bestimmbare Mengen Zucker (μg)	Reagenzien	Erwärmungszeit bei 100° Min.	Lit.
Pentosen in Urin	DC und UV-Spektrometrie	n		Kieselgur G, lproz. $SnCl_2$ in MeOH		p
Klinisch wichtige Zucker in Plasma und Urin	DC	l				q
Mono- und Oligosaccharide	Ionenaustausch-Chromatographie, automatische Analyse			Dowex 1 x 4, Borat-Puffer, Orcin		r
Zucker in Lebensmitteln	GC	n		Hydroxylamine·HCl, Silylierung		s
Pentosen und Hexosen in Pflanzen-Extrakt	DC	l				t
RNS	Cystein	n	10 - 60	Konz. H_2SO_4, Cystein·HCl		u
Zuckergemisch	Chromatographische Autoanalyse HPC	n	10^{-10}M	Tetrazolium-blau		v

Probe	Methode	Qual. (l) resp. Quant. (n)	Bestimmbare Mengen Zucker (μg)	Reagenzien	Erwärmungszeit bei 100° Min.	Lit.
Alge	Papier-elektrophorese	l				w
Human-Urin	Gel-, Gas- und Ionenaustausch-Chromatographie	l				x
Aldosen-Gemisch	GC, Massen-Spektrometrie	n		Me_2CO, 1proz. H_2SO_4		y
In Membranen gebundene Zucker	Kombination von DC, GC und Radiogas-Chromatographie	n	0,4			z
Mono- und Oligo-saccharide	DC	l	2 - 5			35a

Sie wurde bereits von Dische und Schwarz (35b) für die Analyse von Nucleotiden verwendet. Sie hat viele Modifikationen und Verbesserungen erfahren; die am häufigsten angewandte ist die von Mejbaum (34a). Bei der Anwendung der Bialschen Orcin-Methode variieren häufig die Konzentrationen von Orcin, $FeCl_3$ und HCl des verwendeten Reagens und die Erwärmungszeit. Der Orcin-Gehalt im Reagens schwankt zwischen 0,02 - 10 %, und auch die Konzentration der Salzsäure variiert zwischen 4 - 12N. Der Effekt des als Katalysator verwendeten Eisensalzes ist gleich wie mit $FeCl_3$ und Eisenammoniumsulfat, obwohl die Färbung mit $FeCl_3$ intensiver ist. Statt Eisen(III)-Salz kann auch Kupferchlorid verwendet werden (34e). Die Erwärmungszeit des Reaktionsgemisches in siedendem Wasser beträgt 3 - 60 Min. Die Absorption wird im Bereich 540 - 680 nm gemessen. Die Farbe bleibt während einiger Stunden stabil.

Die Bial-Reaktion wurde modifiziert zur Bestimmung von verschiedenen Zuckern und zuckerhaltigen Verbindungen, wie Mono- und Oligosacchariden, Deoxyzuckern, Uronsäuren, Neuraminsäuren, Nucleinsäuren, Nucleosiden und Nucleotiden, Glykoproteiden, Glykosiden und Antibiotika (37).

Modifizierungen zur Bestimmung von Pentosen bei Vorhandensein von Glukose wurden von McKay (34i), Drury (38) und Tomoda (34g) beschrieben.

Bei der Bestimmung von Zuckern, die an Purin-, Pyridin- und Pyrimidin-Basen gebunden sind, muss berücksichtigt werden, dass die glykosidische Bindung verschieden stabil ist und demzufolge unterschiedlich leicht hydrolysiert wird. So muss bei Pyrimidin-gebundenen Zuckern zunächst die glykosidische

Bindung durch Bromierung oder Behandlung mit Natrium-Amalgam oder durch Hydrazinolyse labilisiert werden, bevor die Bialsche Reaktion durchgeführt wird (34f).

Die Bialsche Reaktion ist nicht spezifisch. Sie wird durch die Anwesenheit von Hexosen, Bleiionen, Nitraten, Saccharose, Pentosan, Hexuronsäuren, Polyuroniden, Sialinsäuren, Heptosen, Polysacchariden, Glykogen, grossen Mengen von Proteinen und DNA gestört.

Bei der Anwendung der Bialschen Reaktion ist wichtig, dass die Konzentration der Salzsäure und $FeCl_3$ konstant gehalten wird. Die Probe und die Referenz müssen die gleiche Acidität während des Erwärmens haben. Ein Fehler von bis zu 25 % tritt ein, wenn die Normalität der Probe 0,25 mal grösser ist als die der Referenz (34b). Das Orcinreagens muss frisch bereitet sein und das Erwärmen lange genug dauern. Es muss darauf geachtet werden, dass die Intensität der Farbe nur bei sehr verdünnten Lösungen von Pentosen proportional zur Konzentration ist (34a).

2.3.c. Quantitative Ribose-Bestimmung mit der Orcin-Methode

Von den zahlreichen bekannten Methoden wurde von mir die von Bial (36) gewählt, als die genauere, einfachere und am häufigsten verwendete. Die Bestimmung wurde gemäss dem Kerr- und Seraidarian-Verfahren (34b), eine Modifikation der Mejbaum-Technik (34a), durchgeführt (siehe Exp. 5.1). Die Endkonzentrationen der drei Reagenzien Salzsäure, $FeCl_3$ und Orcin sind gleich mit jener von Morse und Carter (39), nämlich

8,2N, 0,01 % und 0,41 %. Bei der Modellsubstanz Adenosin wurden damit 97 % des Gehaltes an Ribose bestimmt (siehe Tabelle 6).

Eine Reihe von Bestimmungen wurde mit Ribose- und Adenosin-Standardlösungen (Tabellen 4,5) für die Berechnung der entsprechenden Eichkurven (Figur 9) sowie mit Vergleichssubstanzen (Tabelle 6) durchgeführt.

Die Anwendung der Orcin-Methode an Proben von RP-s_{III} aus R.emetica und R.sardonia ist in der Tabelle 7 zusammengestellt. Das berechnete Molekulargewicht von RP-s_{III} (646) stimmt mit dem in (3) postulierten von ca. 650 überein.

Im folgenden Abschnitt werden die bisher angewendeten Methoden zur Bestimmung des Aequivalentgewichtes von RP-s_{III} (an R.emetica, R.sardonia) diskutiert.

Tabelle 4: Ribose-Standardlösungen

Menge Ribose für die Bestimmung (µg)	$E_{max.}$ bei 668 nm der Bestimmungs-Lösung
9	0,381
9	0,413
9	0,418
9	0,416
15	0,633
15	0,633
15	0,633
15	0,689
15	0,623
15	0,622
21	0,951
21	0,918
21	0,895
21	0,874
21	0,884

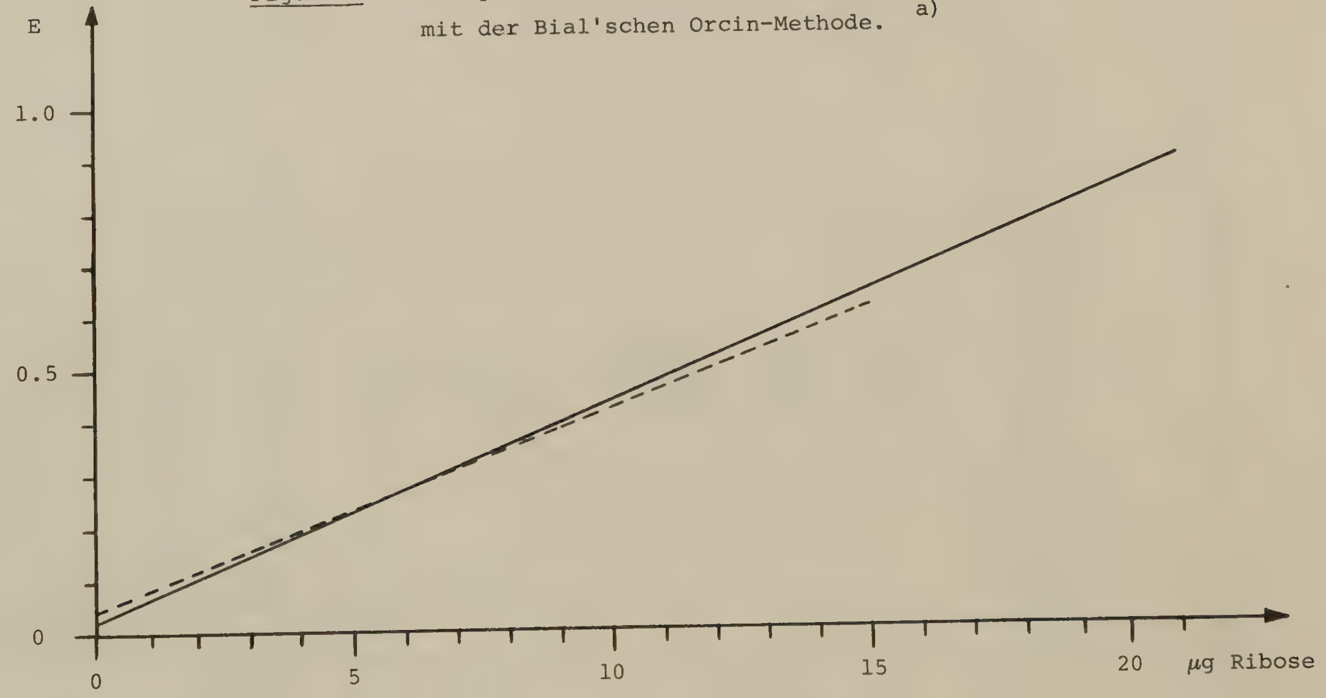
Die Gleichung der idealen Geraden wurde mit der Methode der kleinsten Quadrate berechnet:

$$E = 0,025 + 0,041 \cdot (\mu g)$$

Werte der Eich-Geraden:

µg = 0 E = 0,025
µg = 9 E = 0,399
µg = 15 E = 0,649
µg = 21 E = 0,898

Figur 9: Eichgeraden zur Ribose-Bestimmung mit der Bial'schen Orcin-Methode. a)



a) ——— Ribose, ----- Adenosin

Tabelle 5: Adenosin-Standard-Lösungen

Menge Adenosin für die Bestimmung (μg)	Entspr. Ribose-Gehalt (μg)	$E_{max.}$ bei 668 nm der Bestimmungs-Lösung
16,02	9	0,401
16,02	9	0,373
16,02	9	0,384
16,02	9	0,381
26,7	15	0,628
26,7	15	0,598

Gleichung der idealen Geraden:
$E = 0{,}042 + 0{,}038 \cdot (\mu g)$

Verschiedene Werte:

$\mu g = 0 \quad E = 0{,}042$
$\mu g = 9 \quad E = 0{,}385$
$\mu g = 15 \quad E = 0{,}613$

Tabelle 6: Ribose-Bestimmungen an Vergleichssubstanzen

Substanz	Menge (μg)	Berechn. Ribose-Gehalt (μg)	$E_{max.}$ bei 668 nm der Bestimmungs-Lösung	Gefundene Ribose (μg)	Berechn. Aequiv. Gewicht
Deoxy-D-ribose	15		0	0	
Riboflavin	18		0	0	
D(+)-Glucose	15		0	0	
Cytidin	17	10,5	0	0	
8-β-D-Ribofuranosyl-7-oxo-7,8-dihydrolumazin *) (13), MG 312	21 10,5	10 5	0,346 0,179	7,8 3,8	404 414
Adenosin (M.G. 267)	16,02 26,7	9 15	0,385 0,613	8,65 14,13	278 283
Ribose " "	9 15 21	9 15 21	0,399 0,649 0,898	9 15 21	

*) Freundlicherweise von Prof. W. Pfleiderer, Universität Konstanz, überlassen (die Substanz war nicht ganz rein).

Tabelle 7: Quantitative Ribose-Bestimmung von Russupteridin-s_{III} mit der Bialschen Orcin-Methode.

Substanz	Menge (µg)	$E_{max.}$ bei 668 nm der Bestimmungs-Lösung	Gefundene Ribose (µg)	Berechn. Aequiv. Gewicht	$\overline{M.G.}$	$\overline{M.G.}$
	34,5	0,368	8,2	631,64		
	34,5	0,367	8,2	631,64		
	34,5	0,374	8,4	616,60		
E-s_{III} *)	69,0	0,718	16,6	624,03	636,32	
	69,0	0,735	17,0	609,35		
	69,0	0,666	15,4	672,66		
	69,0	0,673	15,5	668,32		646
	34,5	0,347	7,7	672,66		
	34,5	0,373	8,4	616,60		
	34,5	0,367	8,2	631,64		
S-s_{III} **)	34,5	0,355	7,9	655,63	655,78	
	34,5	0,346	7,7	672,66		
	69,0	0,679	15,7	659,80		
	69,0	0,658	15,2	681,51		

*) Substanz aus Russula emetica ; Präparat von Dr. Iten
**) Substanz aus Russula sardonia; eigenes Präparat

2.3.d. Zum Aequivalent- und Molekulargewicht von RP-s_{III}

Das Molekulargewicht von RP-s_{III} konnte mit den heute zur Verfügung stehenden Methoden unmittelbar nicht gemessen werden.

Weder massenspektrometrische Methoden (wegen fehlender Flüchtigkeit), noch osmometrische Bestimmungen (wegen starker Assoziatbildungen) führten zum Erfolg (1,3).

Die Bestimmung des Molekulargewichtes mit der Ultrazentrifuge (2,4) ergab, dass es grösser als jenes von Drosopterin (MG 436) sein muss.

Hydrierungsversuche führten zur Vermutung, dass das Aequivalentgewicht 322 bzw. das Molekulargewicht 644 beträgt (1). Die quantitative Ribosebestimmung mit der Furfurolmethode ergab ein Aequivalentgewicht von ca. 550, während mit der Periodat-Oxydation ein Molekulargewicht von 644 berechnet wurde (1).

Ich konnte auf Grund der genaueren Methode für die Ribose-Bestimmung ein Aequivalentgewicht von ca. 650 berechnen (siehe Tabelle 7); dies steht in Uebereinstimmung mit dem früher postulierten Molekulargewicht (3). Es ist jedoch noch nicht gesichert, ob das Molekulargewicht von RP-s_{III} nicht doch ein Vielfaches davon beträgt.

2.3.e. Ribose-Bestimmung mit der Cysteinhydrochlorid-Methode - Aglykon von RP-s_{III}

Die Reaktion von Zuckern und zuckerhaltigen Verbindungen, wie Pentosen, Hexosen, Nucleotiden, Nucleosiden und Nucleinsäuren mit konz. H_2SO_4 zu farblosen Produkten mit einem starken UV.-

Absorptions-Maximum bei 270 - 320 nm, Furfural und Homologe, wurde von vielen Autoren beschrieben. Das Maximum der entstehenden Produkte variiert je nach Zuckerart, Reaktionstemperatur und Konzentration der Schwefelsäure. Nachfolgend sind einige der verwendeten Methoden kurz dargestellt.

Dische (34d) liess die wässrige Lösung von Zuckern und Glykosiden mit konz. H_2SO_4 im Verhältnis 1:4 reagieren. Nach Abkühlen der Lösung erhielt er das entsprechende Produkt, das während einiger Stunden stabil blieb.

Ikawa und Niemann (40) haben für die quantitative Bestimmung des Ribosegehaltes in Nucleinsäure und deren partialen Hydrolyseprodukten Adenosin und Cytidin in 70proz. H_2SO_4 bei 100^o während 15 Min. erwärmt und das Absorptions-Maximum bei 307 nm gemessen.

Durch die gleichzeitige Bestimmung des Ribose- und Deoxyribose-Gehaltes berechnete Byvoet (41) den RNA- und DNA-Gehalt von tierischen Geweben. Er behandelte 0,1 ml der Probe mit 3 ml konz. H_2SO_4 und konnte nach 5 Stunden die Absorption bei 320 nm für RNA und bei 470 nm für DNA messen.

Für die Bestimmung von Hexosen, Pentosen und Uronsäuren liessen Millett et al. (34k) 0,25 ml der zuckerhaltigen Lösung während 30 Min. mit 2 ml 75proz. H_2SO_4 bei 70^o reagieren. Das UV.-Maximum wurde anschliessend im Bereich von 298 - 320 nm gemessen. Millett untersuchte ebenfalls für verschiedene Zucker die Abhängigkeit der Wellenlänge des Absorptionsmaximums der entstehenden Produkte von Schwefelsäure-Konzentration und Temperatur.

Wenn man das durch die Wirkung von konz. H_2SO_4 entstehende Produkt mit Cystein-Hydrochlorid reagieren lässt, entsteht nach kurzer Zeit ein neues Produkt mit einem Absorptionsmaximum zwischen 375 und 410 nm (34d).

Dieses Verfahren wurde später von Messineo und d'Amico (34u) für die Bestimmung der Ribose ohne Beeinflussung durch Deoxyribose modifiziert.

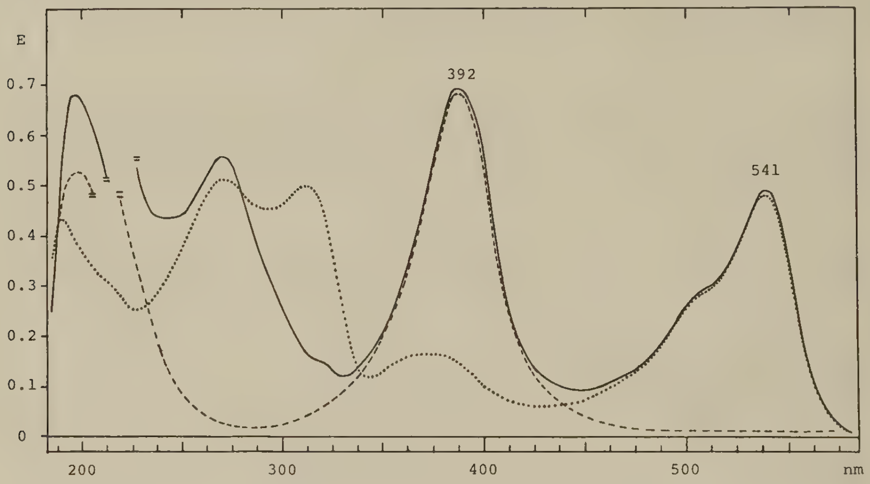
Von mir wurde die von Messineo und d'Amico beschriebene Methode für die Bestimmung der Ribose an RP-s_{III} angewendet. Das Absorptionsmaximum wurde bei 392 nm gemessen (siehe Tabelle 8). Die Farbe der Lösung blieb rot.

Tabelle 8: Anwendung der Cystein-Hydrochlorid-Methode für die Ribose-Bestimmung.

Substanz	Menge (µg)	Absorptions-Maximum bei 392 nm (E)
Ribose	15	0,279
E-s_{III}	69	0,538
Deoxy-Ribose	15	0

Aus den UV/VIS-Spektren (siehe Figur 10, exp. Teil, S. 90) sowie aus der intensiven roten Farbe der Probe- und Referenzlösung ist zu schliessen, dass unter der Einwirkung von Schwefelsäure auf das RP-s_{III} nur der Ribosyl-Rest abgespalten wird, während sein Chromophorsystem stabil bleibt. Dies

Figur 10: UV/VIS.-Spektren der Ribose-Bestimmung von Russupteridin-s_{III} mit der Cystein-Hydrochlorid-Methode. a), b)



a)

Spektrum A ----	Probe [1]:	69 µg RP-s_{III} in 1 ml H_2O + 5 ml konz. H_2SO_4 + 0,05 ml 5proz. Cys·HCl
	Ref. [2]:	69 µg RP-s_{III} in 1 ml H_2O + 5 ml konz. H_2SO_4 + 0,05 ml H_2O
Spektrum B ——	Probe: [1]	Ref.: 1,05 ml H_2O + 5 ml konz. H_2SO_4
Spektrum C ····	Probe: [2]	Ref.: 1,05 ml H_2O + 5 ml konz. H_2SO_4

b)

Spektrum A In der Probelösung sollte sich der Ribosyl-Teil unter der Einwirkung von H_2SO_4 zur Furfural-Bildung abspalten und das Furfural mit Cys·HCl zur Bildung eines neuen Produktes weiter reagieren.
In der Referenzlösung sollte sich der Ribosyl-Teil zur Furfural-Bildung abspalten.
Das UV-Spektrum zeigt die Absorption des Reaktionsproduktes von Furfural mit Cys·HCl. λmax. (nm) (E) 392(0,540).

Spektrum B Das UV-Spektrum zeigt wahrscheinlich die Absorption des Reaktionsproduktes von Furfural mit Cys·HCl (bei 392 nm) sowie jene des nach der Spaltung von Ribose verbliebenen Teils des RP-s_{III}.

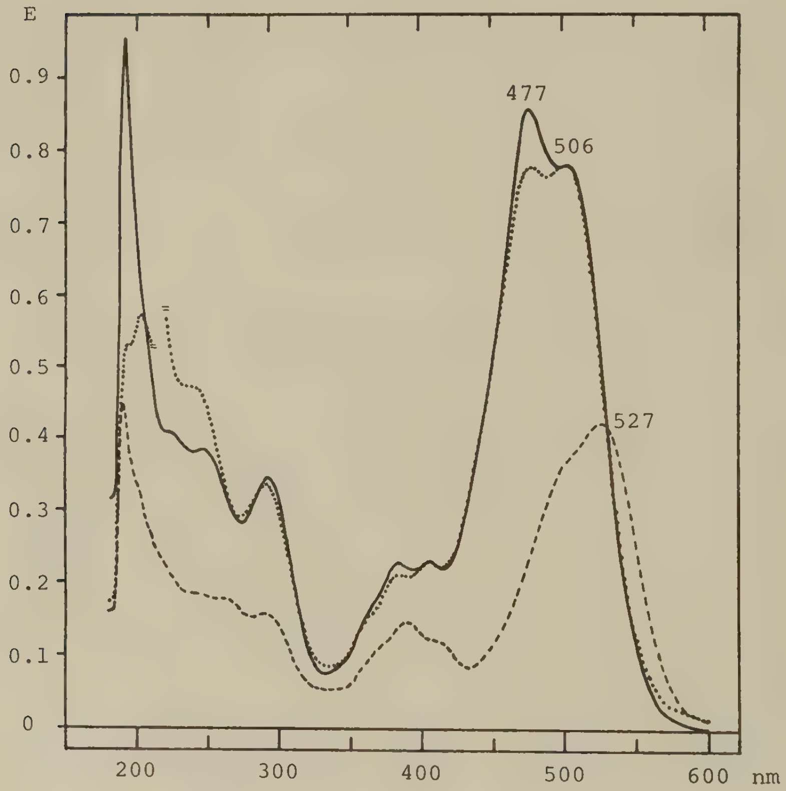
Spektrum C Das Spektrum sollte die Absorption des Furfurals bei 314 nm und des nach der Spaltung von Ribose verbleibenden Teils von RP-s_{III} zeigen.

ist bei der Einwirkung von Salzsäure für die Ribose-Bestimmung mit der Orcin-Methode nicht der Fall. Auf Grund dieser Beobachtung wurde versucht, das Aglykon von RP-s_{III} durch Behandlung mit Schwefelsäure herzustellen.

Versuche von Iten (2,4), mit sauren Hydrolysen unter verschiedenen Bedingungen oder durch Einwirkung von Nucleosidasen aus Bäckerhefe und Nucleosidphosphorylase aus Kalbsmilz das Aglykon von RP-s_{III} zu erhalten, führten zu negativen Ergebnissen. Entweder wurde der Farbstoff schneller zu gelben und farblosen fluoreszierenden Produkten abgebaut als Ribose abgespaltet wurde (das Ribosyl zeigt grössere Hydrolysebeständigkeit als das Chromophor selbst), oder es fand keine Reaktion statt.

Von mir konnten nach zweistündiger Behandlung von kleinen Mengen RP-s_{III} mit konz. Schwefelsäure, Neutralisation der Lösung und Säulenchromatographie zwei rote Produkte isoliert werden, deren UV/VIS.-Spektren in Figur 11 abgebildet sind. Sie enthalten zweifellos ein RP-s_{III} sehr ähnliches Chromophorsystem. Wichtig ist der Beweis durch die qualitative Ribose-Bestimmung mit der Orcin-Methode, dass diese Produkte frei von Ribose sind. Weitere Experimente mit diesen Produkten konnten nicht mehr durchgeführt werden. Diese Derivate sind aber ohne Zweifel wertvoll für weitere Untersuchungen.

Figur 11: UV/VIS.-Spektren von Russupteridin-s_{III} -----
und der durch seine Behandlung mit konz. H_2SO_4
entstehenden Produkte ———, ····· a)



---

a) in H_2O

2.4. DRUCKHYDROLYSE VON RUSSUPTERIDIN-s_{III}

Iten (2,4) konnte von den zahlreichen Produkten der sauren Hydrolysen von Russupteridin-s_{III} die Lumazin-Derivate 1, 2, 4, 9 isolieren und identifizieren. Er beschreibt auch die Gewinnung aus der Hydrolyse von Russupteridin-s_{III} von dunkelblau fluoreszierenden, ribosehaltigen Produkten, die ein Chromophorsystem ähnlich demjenigen von 7,8-Dihydro-6-methyl-7-oxo-8-ribityl-lumazin (2) bzw. 7,8-Dihydro-7-oxo-8-ribityl-lumazin (1) besitzen.

Wenn die Gewinnung dieser Ribityl-lumazin-Derivate bedeutet, dass sie einen Teil des Moleküls von Russupteridin-s_{III} repräsentieren, bleibt noch die Strukturaufklärung des restlichen, ribosehaltigen Teils des Moleküls zu untersuchen. Auf Grund der angenommenen dimeren Pteridin-Struktur von RP-s_{III} sowie der Isolierung der von Iten (4) erwähnten ribosehaltigen Hydrolyseprodukte sollte dieser unbekannte Teil des Moleküls ein Pteridin-(Lumazin- oder Pterin-)Ribosid sein.

Um den ribosehaltigen Teil von RP-s_{III} zu erkennen, wurde seine Hydrolyse unter den gleichen wie (4) sowie milderen Bedingungen wiederholt und nach den von Iten erwähnten und anderen Ribosylprodukten gesucht, die Informationen über die Natur dieses Teils des Moleküls liefern könnten.

Die Bombenrohr-Hydrolyse von RP-s_{III} wurde zweimal in Wasser und einmal in 2proz. Essigsäure durchgeführt. Der erste Ansatz von 50 mg RP-s_{III} in Wasser ergab eine grosse Vielfalt an orangen, gelben und farblosen, blau fluoreszierenden Verbindungen, die nach mehrfacher Säulenchromatographie isoliert

wurden. Von den 19 Hydrolyseprodukten wurden DC, UV.- und Protonen-NMR.-Spektren aufgenommen (siehe Tabellen 13,14).

Als sehr interessant erschien die Zone Z_{12a}. An den Cellulose-Dünnschichtchromatogrammen weist diese Zone identische R_f-Werte auf wie 7,8-Dihydro-7-oxo-8-ribityl-lumazin (1). Analoges beobachtet man bei DEAE-Cellulose-Dünnschichtchromatogrammen (siehe Tabelle 17).

Dieses Hydrolyseprodukt besitzt ein den Lumazinen 1, 2, 13 *) und 14 **) ähnliches Chromophorsystem. Ein UV.-Datenvergleich mit diesen Lumazinen ist in der Tabelle 18 dargestellt. Der Kurvenverlauf sowie die Wellenlänge der Maxima und Minima in allen drei pH-Bereichen sind denjenigen von 7,8-Dihydro-7-oxo-8-ribityl-lumazin sehr ähnlich (Figur 12). Ein wesentlicher Unterschied besteht in der Intensität der Spektren der beiden Substanzen. Es ist ein hyperchromer Effekt der Spektren von Z_{12a} gegenüber jenen von 7,8-Dihydro-7-oxo-8-ribityl-lumazin zu beobachten.

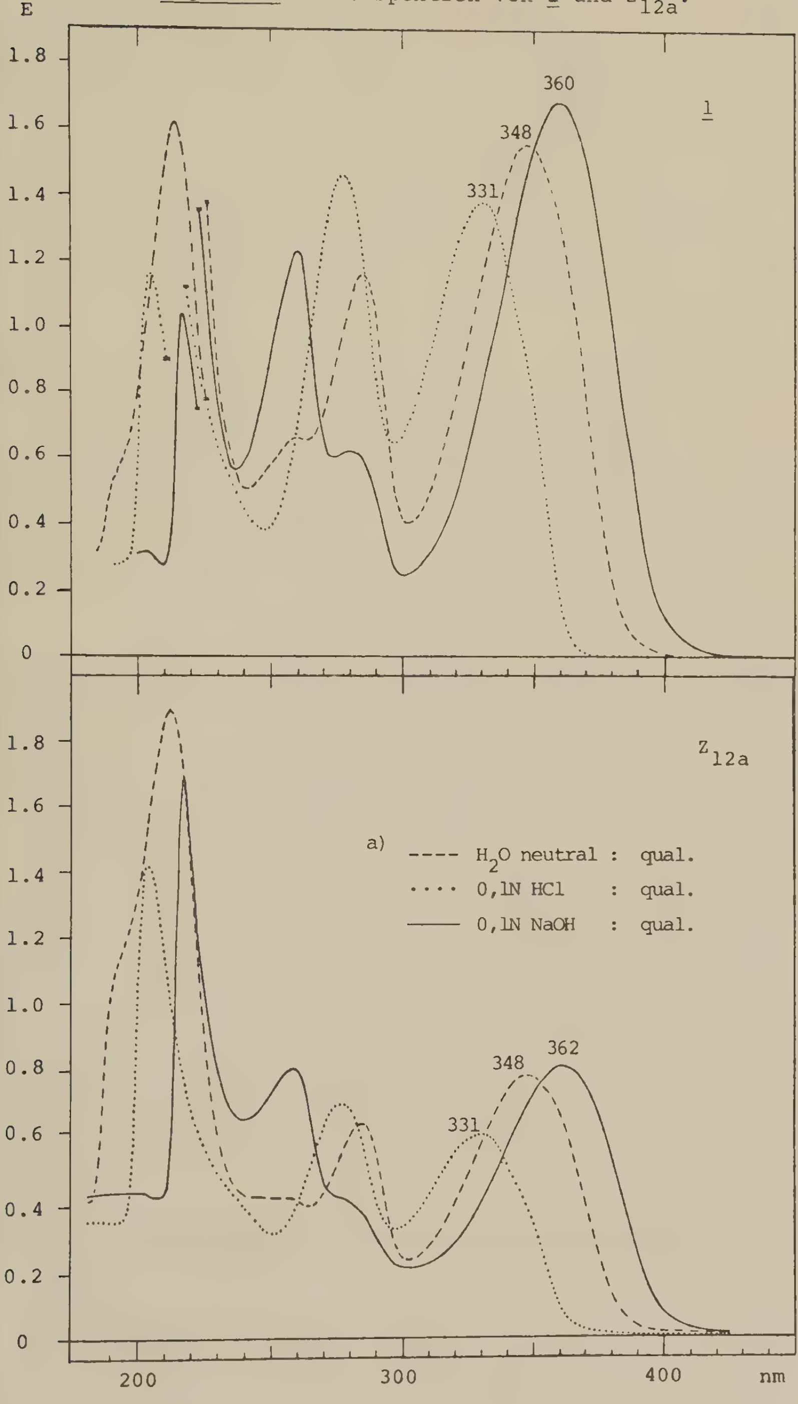
Im ^{1}H-NMR.-Spektrum von Z_{12a} (siehe Figur 13) erscheint neben den Ribityl-Protonen zwischen 4 und 5,5 ppm ein Multiplett bei 1,9 ppm, welches jedoch integralmässig nicht einer Methyl-Gruppe zugeordnet werden kann. Es handelt sich vermutlich um eine Verunreinigung. Oberhalb von 5,5 ppm ist kein Signal mehr sichtbar.

Wenn es sich bei Z_{12a} um das 7,8-Dihydro-7-oxo-8-ribityl-lumazin (1) handeln sollte, müsste bei ca. 7,5 ppm ein Singulett, welches H-C(6) entspricht, erscheinen. Dass bei Z_{12a} kein Ribosylrest vorhanden ist, kann einerseits durch die Abwesenheit des anomeren Protons im ^{1}H-NMR.-Spektrum und ander-

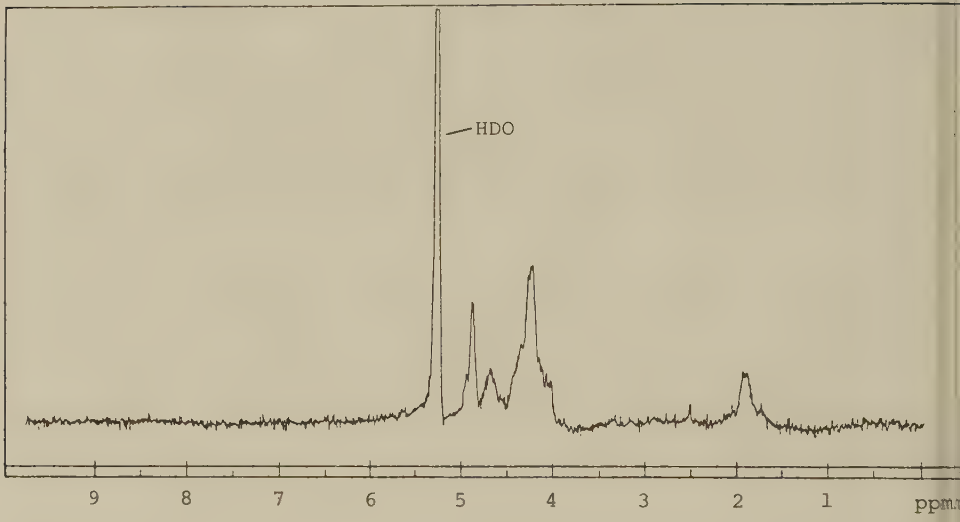
---

*) s. Seite 39, **) s. Seite 100

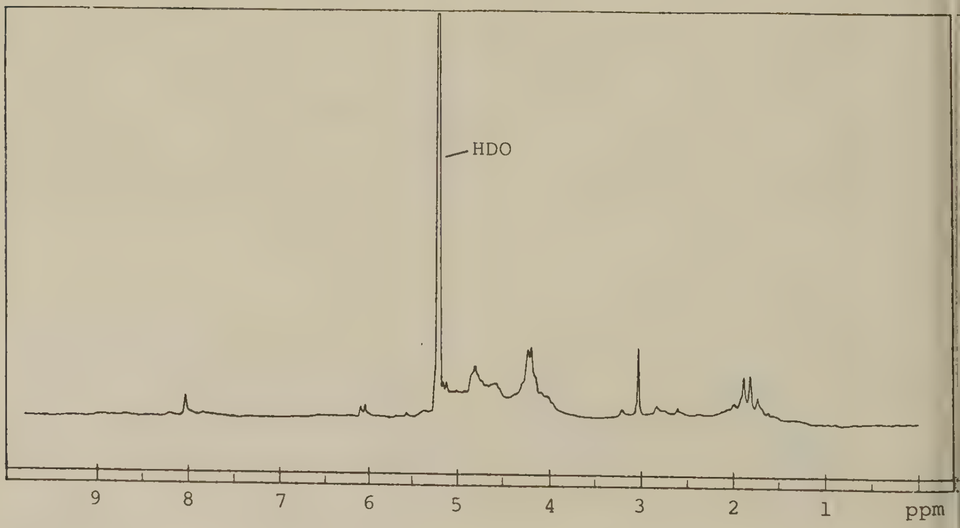
Figur 12: UV.-Spektren von 1 und Z_{12a}. a)



Figur 13: PFT-^{1}H-NMR.-Spektrum von Z_{12a}. a)



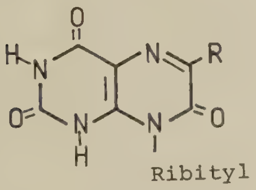
Figur 14: PFT-^{1}H-NMR.-Spektrum von Ze_2. a)



---

a) in D_2O

seits durch die negative Ribose-Bestimmung bestätigt werden. Das ^{1}H-NMR.-Spektrum schliesst jedoch nicht aus, dass bei Z_{12a} noch zusätzliche Methylen- resp. Methin-Protonen vorhanden sind, die eventuell mit den Ribityl-Protonen zusammenfallen. In Frage kämen die beiden Verbindungen 6-Hydroxymethyl-7-oxo-8-ribityl-7,8-dihydrolumazin (15) und 6-(1,2-Dihydroxy-aethyl)-7-oxo-8-ribityl-7,8-dihydrolumazin (16). *)



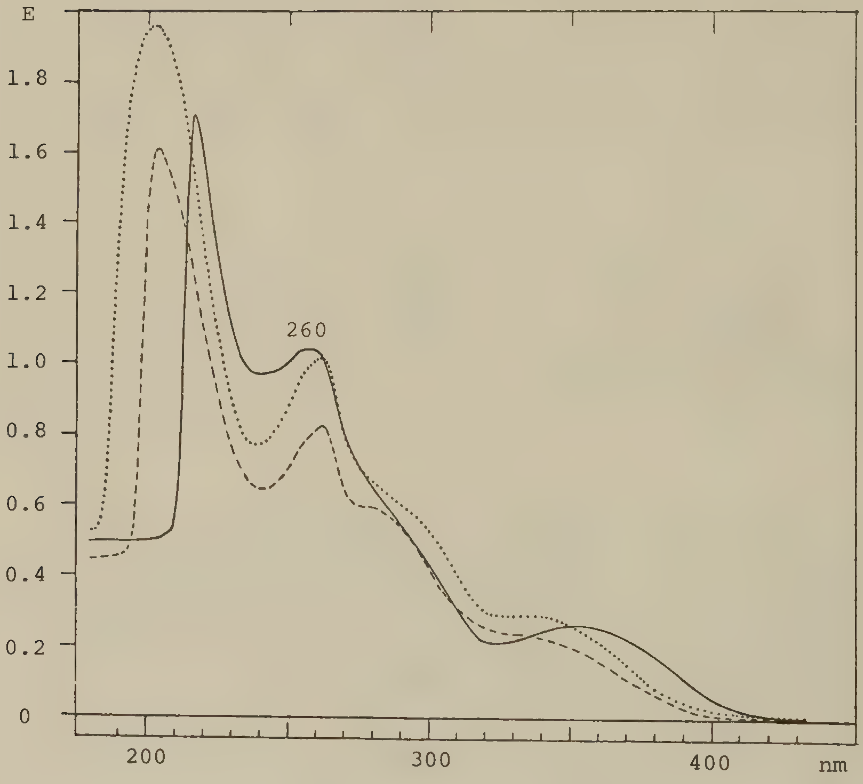
15 R = CH_2OH
16 R = $CHOHCH_2OH$

Dies konnte jedoch einerseits dünnschichtchromatographisch und andererseits UV.-spektrometrisch ausgeschlossen werden. Da zu wenig Abbauverbindung Z_{12a} und auch keine weiteren Vergleichsmaterialien zur Verfügung standen, musste die weitere Strukturaufklärung aufgegeben werden.

Bei einer analogen Bombenrohr-Hydrolyse von 100 mg $RP\text{-}s_{III}$ in Wasser wurde wiederum die oben beschriebene Zone Z_{12a} gefunden. Daneben isolierte man eine neue Verbindung Ze_2. Diese Substanz besitzt ein UV.-Chromophorsystem (siehe Figur 15), das jenem von Lumazinen nicht entspricht. Sie enthielt gemäss Protonen-NMR.-Spektrum (Figur 14) und Ribose-Bestimmung einen Ribosylrest. Das Dublett des anomeren Pro-

*) Freundlicherweise von Herrn Prof. Sadao Matsuura, Department of General Education, Nagoya University, Japan, erhalten.

Figur 15: UV/VIS.-Spektren des Hydrolyse-Produktes Ze_2 von Russupteridin-s_{III}. a)



a) ····· H_2O neutral : qualitativ
----- 0,1N HCl : qualitativ
—— 0.1N NaOH : qualitativ

tons (J = 6 Hz) konnte bei 6,07 ppm beobachtet werden. Im ^{1}H-NMR.-Spektrum erschien weiter ein Singulett bei 8,03 ppm und 3,04 ppm. Das erste kann einem Methin-Proton eines Heteroaromaten zugeordnet werden, während das andere einer Methyl-Gruppe entsprechen könnte. Analog zum ^{1}H-NMR.-Spektrum von Z_{12a} erscheint ein Multiplett bei 1,8 ppm, das nicht interpretierbar ist.

Bei der Bombenrohr-Hydrolyse in 2proz. Essigsäure konnte dünnschichtchromatographisch wiederum die Bildung von zahlreichen Produkten beobachtet werden. Da nur 10 mg RP-s_{III} hydrolysiert wurden, konnten wegen den zu kleinen Mengen der verschiedenen Produkte nur UV.-Spektren aufgenommen werden. Bei der Zone V_6 handelte es sich auf Grund der DC um ein Gemisch von drei Substanzen. Das UV.-Spektrum entspricht jedoch demjenigen von 6-Methyl-7-oxo-8-ribityl-7,8-dihydrolumazin (2). Analog verläuft das UV.-Spektrum bei der Zone V_7. Diese ist einheitlich. Beide Zonen ergaben eine negative Ribose-Bestimmung.

Bei allen drei durchgeführten Hydrolysen von RP-s_{III} wurden die erwähnten Abbauverbindungen isoliert, die ein zu 2 ähnliches Chromophorsystem besitzen. Ihre Ribose-Bestimmung war jedoch negativ. Daraus könnte man schliessen, dass der ribosehaltige Teil von RP-s_{III} kein Lumazin ist.

2.5. OXYDATIVER ABBAU AN RUSSUPTERIDIN-s_{III}

Das Prinzip zur Strukturaufklärung einer unbekannten Verbindung durch Ueberführung in kleinere bekannte oder leicht zu identifizierende Produkte wird oft angewendet. Hierfür geeignete Methoden sind die Ozonolyse, die Oxydation und die Hydro-

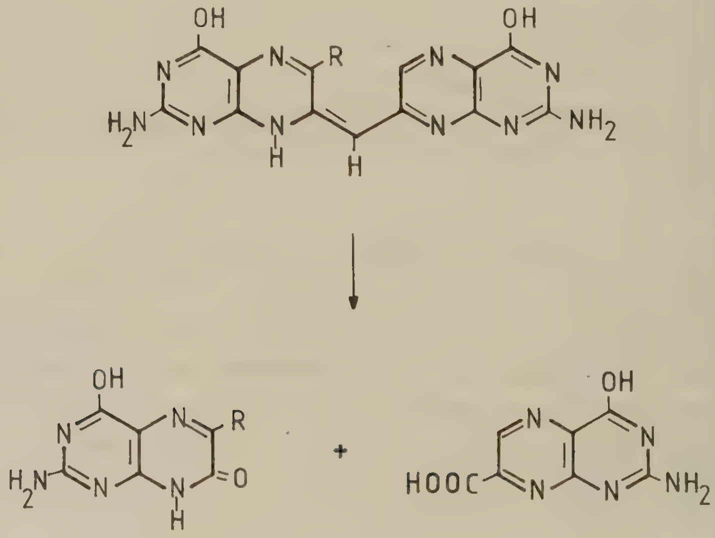
lyse des zu untersuchenden Moleküls. Ueber den hydrolytischen Abbau von RP-s_{III} haben vor allem (1) und (2) gearbeitet. Die dabei erhaltenen Resultate sind auf Seiten 12-14 zusammengefasst. Bisher konnte allerdings noch kein Bruchstück mit intakter Ribosylgruppe identifiziert werden. Deshalb untersuchte ich oxydative Abbaumethoden, mit dem Ziel, ein Bruchstück mit der Ribosylgruppe zu isolieren.

2.5.a. Ozonabbau

Eine erste Anwendung des Ozonabbaues in der Pteridin-Chemie wurde von Karrer und Schwyzer (42) beschrieben. Diese Autoren ozonisierten die von ihnen synthetisierten Verbindungen Pteridinrot (17) und Methylpteridinrot (18) während ca. 7 Std. in Ameisensäure bei einer Temperatur von 0 - 10°. Sie erhielten 2-Amino-4-hydroxy-pteridin-7-carbonsäure (19) aus beiden Verbindungen und Isoxanthopterin (20) bzw. Methyl-isoxanthopterin (21) aus Pteridinrot bzw. Methylpteridinrot.

17 R = H

18 R = CH_3

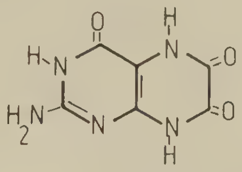


20 R = H

21 R = CH_3

19

Analog zu der erwähnten Methode wurde von Iten (2,4) der Ozonabbau von Russupteridin-s_{III} in Ameisensäure durchgeführt. Er konnte kein Leukopterin (22) nachweisen, dessen Gewinnung in (3) durch Ozonabbau von RP-s_{III} beschrieben ist. Nach Iten könnte das in (3) gefundene Leukopterin eine Verunreinigung von RP-s_{III} sein.



22

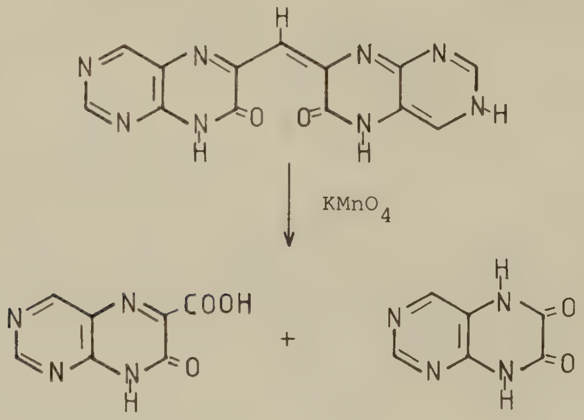
Von mir wurde versucht, möglichst milde Bedingungen für die Ozonisierung zu finden, unter denen der Abbau des Moleküls bis zu jenem Punkt führen könnte, wo man die für die Strukturaufklärung des Farbstoffes geeigneten Produkte, insbesondere ein N-Ribosylderivat, erhält.

Unsere Versuche haben gezeigt (siehe Exp. 8), dass Russupteridin-s_{III} in Methanol/Wasser 1:4:10 (mg RP-s_{III} : ml H_2O : ml MeOH) mit einer Zufuhr von 2,72 mg Ozon pro Min. bei -70^o in 4 Min. partiell abgebaut werden kann. Die Lösung zeigte dann einen Farbumschlag von rot nach gelb. Nach der Zugabe von Dimethylsulfid (43) zur Reduktion von Hydroperoxiden und nach langsamem Erwärmen der Lösung konnte gezeigt werden, dass kein RP-s_{III} mehr vorhanden war und dass neue gelbe und farblose, blau fluoreszierende Produkte entstanden waren.

Parallel zum Ozonabbau wurden Abbauversuche von RP-s_{III} mit $KMnO_4$ durchgeführt. Von den zwei möglichen Verfahren für den oxydativen Abbau von RP-s_{III} wurde jenes der $KMnO_4$-Oxydation als das einfachere gewählt.

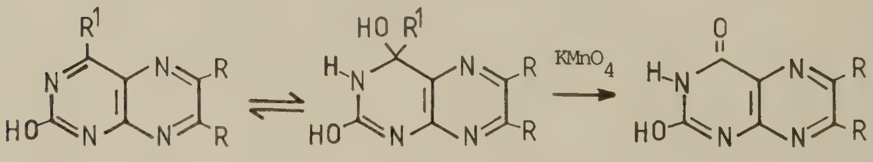
2.5.b. Kaliumpermanganat-Oxydation an Russupteridin-s_{III}

In der Pteridin-Chemie wird die $KMnO_4$-Oxydation einerseits für oxydative Spaltung Kohlenstoff-Kohlenstoff-Bindungen, vgl. zum Beispiel (44-47)



Literaturzitat (45)

und anderseits für die Lokalisierung der Hydratisierungsstelle an einem bestimmten Molekül verwendet (48). Die geeignete C=N-Bindung des Pteridin-Moleküls wird hydratisiert und das gebildete Aminocarbinol mit Kaliumpermanganat zu der entsprechenden Oxo-Verbindung umgewandelt.



R = H R^1 = H oder Me

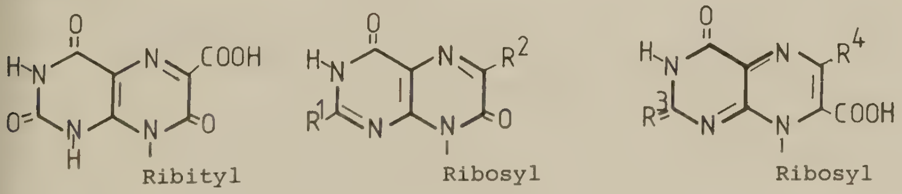
R = Me R^1 = H oder Me

Es wird angenommen, dass das zu einer Carbonylgruppe oxydierte Kohlenstoffatom jenes ist, bei dem aus der Hydratisierung die Hydroxylgruppe entsteht. Diese Methode wird ebenfalls angewendet, wenn eine Methylgruppe an der Hydratisierungsstelle vorhanden ist (49). Durch die $KMnO_4$-Oxydation in einem für die Hydratbildung geeigneten pH werden solche C-Me-Gruppen leicht von dem hydratisierten Molekül entfernt.

Oxydationsversuche an $RP\text{-}s_{III}$

Bereits Frauenfelder (1) hatte eine wässrige Lösung von $RP\text{-}s_{III}$ mit $KMnO_4$ solange oxydiert, bis die Permanganatfarbe verschwand und sich die Lösung braun färbte. Nach Aufarbeitung konnte er eine im UV intensiv blau fluoreszierende Substanz isolieren. Diese war in alkalischem Milieu labil und zeigte elektrophoretisch einen stark basischen Charakter. Nach Frauenfelder war sie nicht identisch mit bekannten 2-Amino-4-hydroxy-pteridinen und dem 2-Amino-6-hydroxy-pteridin, und er konnte auch ausschliessen, dass es sich um eine Pteridincarbonsäure handelte. Ein Vergleich der UV.-Spektren mit den von mir erhaltenen Produkten (siehe Seite 69) zeigt, dass die von Frauenfelder isolierte Substanz möglicherweise mit dem von mir isolierten $MnOx_3$ identisch ist.

Auf Grund der von Iten, Eugster und Arihara vorgeschlagenen Strukturmöglichkeiten von $RP\text{-}s_{III}$ sind aus der $KMnO_4$-Oxydation Produkte mit folgenden Strukturen zu erwarten, wie zum Beispiel:



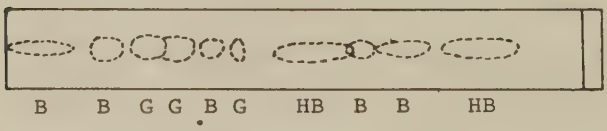
R^1= OH, NH_2 R^2=COOH,OH R^3=O, NH R^4=OH, H

Solche Produkte sollten farblos bis höchstens hellgelb sein, das langwellige Absorptionsmaximum bis 380 nm liegen und ihr MG bis ca. 360 betragen. Bei einer anderen Strukturmöglichkeit, nämlich einer 7,6'- bzw. 7,7'-Verknüpfung der beiden Monomere,wäre durch die $KMnO_4$-Oxydation 6-Methyl-7-oxo-8-ribityl-7,8-dihydrolumazin (2) zu erwarten.

Die $KMnO_4$-Oxydation von RP-s_{III} wurde von mir wie folgt durchgeführt:

Wie ein Mikroversuch zeigte (vgl. Figur 16, Exp. 9.1.), wird RP-s_{III} durch Zugabe von $KMnO_4$ sehr schnell oxydiert. Bei dieser Reaktion entstehen neue Produkte mit UV.-Maxima bei 425, 388, 267 und 220 nm, deren Herstellung in präparativem Massstab aussichtsreich schien. Danach wurde eine sorgfältige Oxydation von grösseren Mengen RP-s_{III} durchgeführt (vgl. Exp. 9.2.).
In den Oxydationsprodukten wurde nach einer möglichen Entstehung von V-Compound (2) gesucht. Dünnschichtchromatographisch konnte diese jedoch nicht nachgewiesen werden. Es wäre aber möglich, dass die eventuell gebildete Verbindung unter den Oxydationsbedingungen unbeständig ist. Deshalb wurde eine $KMnO_4$-Oxydation an 2 durchgeführt, welche die obige Vermutung bestätigte. Somit konnte die gesuchte Verbindung auf diesem Wege nicht nachgewiesen werden.

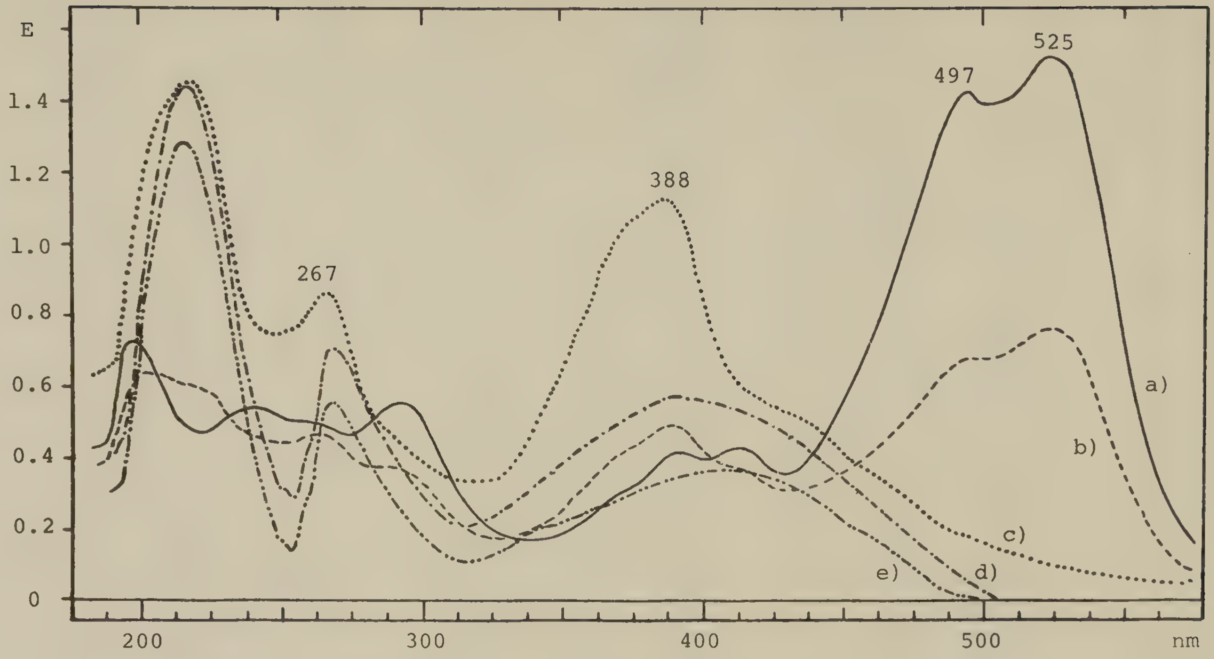
Von den zahlreichen Oxydationsprodukten



CM-Cellulose
1proz. AcOH

Fluoreszenzfarben UV_{350} : B = blau, G = gelb,
HB = hellblau

Figur 16: $KMnO_4$-Oxydationsverlauf von Russupteridin-s_{III} [a)]
Mikroversuch.



---

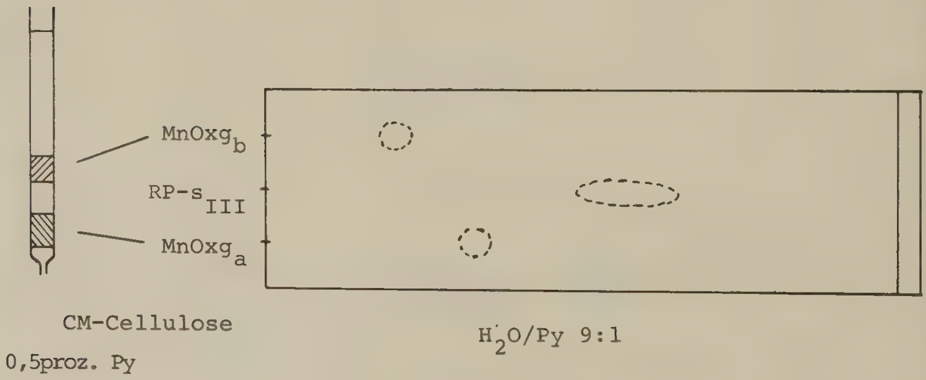
a) Probe: 0,08 mg Russupteridin-s_{III} in 2,5 ml 0,5proz. AcOH, Ref. 2,5 ml 0,5proz. AcOH Nach Zugabe in Probe und Referenz von je 5 [b)], 10 [c)] (E·0,5), 15 [d)] (E·0,5) und 25 [e)] (E·0,5) Tropfen 0,0036proz. $KMnO_4$-Lösung in H_2O.

wurden folgende isoliert und weiter untersucht (die grosse Zahl der entstehenden Produkte, ihre Labilität und schwere Löslichkeit machten ihre Isolierung und Untersuchung ziemlich schwierig):

Isolierung und Charakterisierung der beiden gelben Oxydationsprodukte $MnOxg_a$ und $MnOxg_b$

Während der sorgfältigen Oxydation von $RP\text{-}s_{III}$ war ein langsamer Farbumschlag von rot nach gelb zu beobachten. Die Reaktion wurde bis zu jenem Stadium durchgeführt, bis sich die Lösung gelb färbte und der Rot-Ton völlig verschwunden war. Die Fluoreszenz der erhaltenen Lösung war blau. Die Oxydation führt wahrscheinlich zuerst zu gelben Produkten, die weiter zu farblosen, blau fluoreszierenden Produkten abgebaut wurden. Mit Hilfe der Säulenchromatographie an Cellulose- und CM.-Cellulose konnten zwei gelbe Produkte, $MnOxg_a$ und $MnOxg_b$, isoliert werden; siehe Figur 17.

Figur 17: Säulen- und Dünnschichtchromatographie von $MnOxg_a$ und $MnOxg_b$.



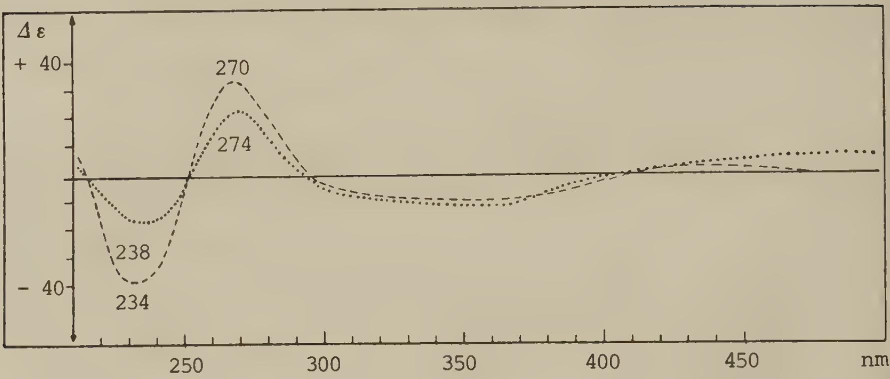
Die beiden gelben Substanzen sind nach Isolierung in sauren und neutralen Lösungen sowie an der Luft unstabil, in basischem Milieu (pH ca. 7) dagegen etwas stabiler. Aus der Papierelektrophorese (siehe exp. Teil, Seite 104) resultiert, dass es sich beim Gemisch der beiden gelben Substanzen um solche mit basischem Charakter handelt. Die CD.-Spektren der beiden Verbindungen (Figur 18) zeigen darüber hinaus, dass sie optisch aktiv sind. Sie sind dem CD.-Spektrum von RP-gelb$_{IV}$ (<u>6</u>) sehr ähnlich (9), was auf das Vorhandensein einer Ribitylgruppe in diesen Abbauprodukten hinweist. Der Vergleich mit CD.-Spektren von D-Ribofuranosyl-pteridinen (50,51) bestätigt, dass die in RP-s$_{III}$ enthaltene Ribosylgruppe der D-Reihe angehört.

Ein Vergleich der UV.-Spektren der beiden gelben Produkte MnOxg$_a$ und MnOxg$_b$ (Figur 19) mit jenem des Eduktes ergibt eine gewisse Aehnlichkeit und eine hypsochrome Verschiebung von 100 nm. Somit kann man annehmen, dass es sich nicht mehr um dimere, sondern eher um monomere Produkte handelt. Beim Vergleich der UV.-Spektren von MnOxg$_a$ und MnOxg$_b$ fällt auf, dass ihr Kurvenverlauf praktisch identisch ist. Man darf vermuten, dass MnOxg$_a$ und $_b$ nicht aus verschiedenen Teilen des dimeren RP-s$_{III}$ stammen.

Ein weiterer UV.-Spektren-Vergleich mit RP-gelb$_I$ (<u>5</u>), RP-gelb$_{II}$ und RP-gelb$_{IV}$ (<u>6</u>) ergibt keine Aehnlichkeit (6,7).

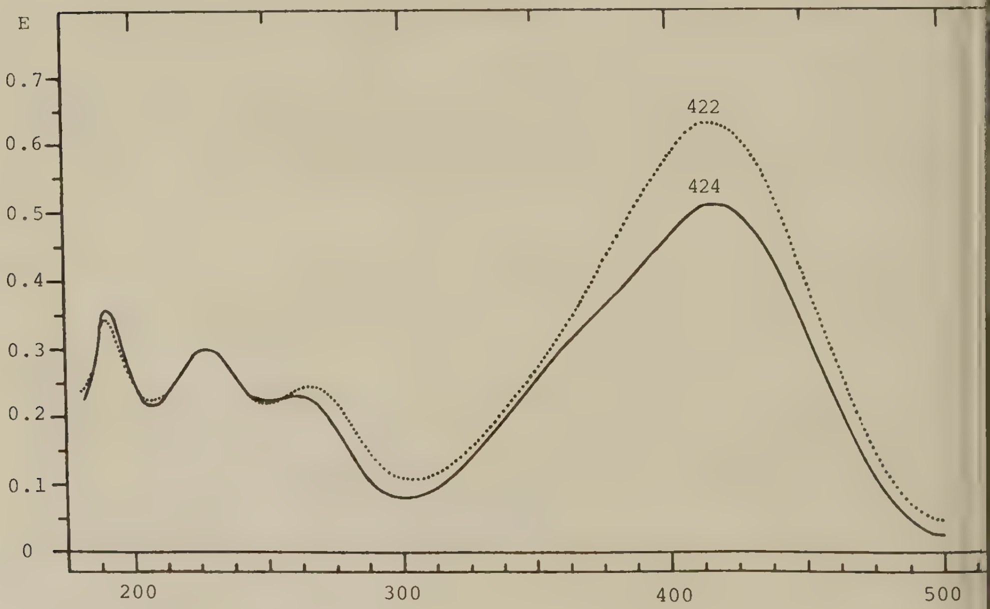
Die Suche in der Literatur nach Modellsubstanzen, die ein ähnliches Chromophorsystem besitzen, ergab, dass der Kurvenverlauf der Spektren von MnOxg$_a$ und $_b$ ähnlich dem von 1,3-Dimethyl-7-hydroxy-2,4-dioxo-tetrahydropteridin-carbonsäure-(6) (52) sowie dem von 2-Amino-4-methoxy-7-oxo-8-β-D-

Figur 18: Qualitative CD.-Spektren von MnOxg$_a$ ---- und MnOxg$_b$ .... a)



a) in H_2O, d = 10 mm, Empf. $1 \cdot 10^{-5}$/mm

Figur 19: UV/VIS.-Spektren von MnOxg$_a$ .... und MnOxg$_b$ ——. a)



a) c = 0,17 mg in 5 ml H_2O

ribofuranosyl-7,8-dihydropteridin (50) ist. In beiden Fällen ist eine hypsochrome Verschiebung der langwelligen Hauptmaxima gegenüber jenen der Abbauprodukte um ca. 70 nm zu beobachten.

Die Ribose-Bestimmung

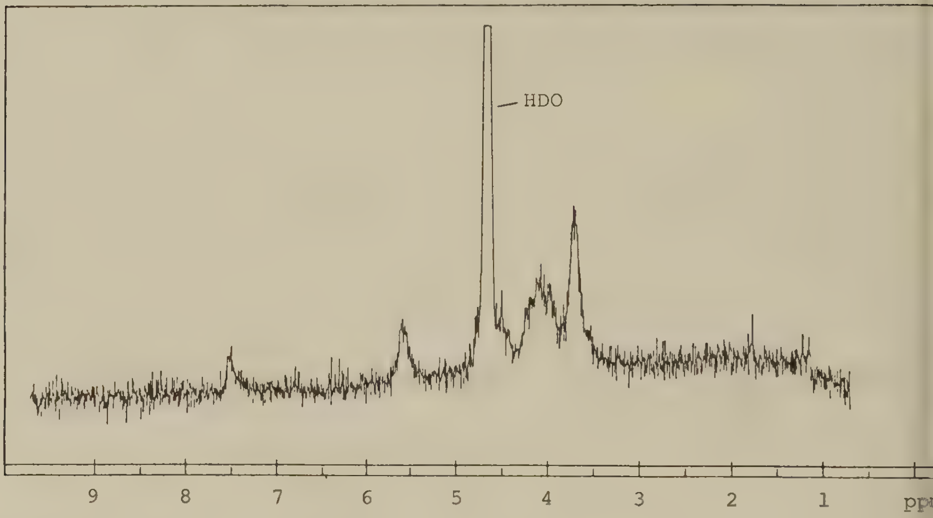
Tabelle 9: Ribose-Bestimmung von $MnOxg_a$ und $MnOxg_b$.

Substanz	UV/VIS.-Spektren		Ribose-Bestimmung			Berechn. Aequiv. Gewicht
	c mg in 5 ml H_2O	Langwell. Maximum E_{max} (nm)	Substanz-Menge (µg)	E_{max} (nm)	Gefund. Ribose (µg)	
$MnOxg_a$	0,17	1,280(422)	34	0,465(668)	10,6	481
$MnOxg_b$	0,17	1,038(424	34	0,423(668)	9,6	531

zeigte, dass sowohl $MnOxg_a$ als auch $MnOxg_b$ Ribosyl-Verbindungen sind. Die quantitative Bestimmung der Aequivalentgewichte ergab für $MnOxg_a$ 481 und für $MnOxg_b$ 531 Masseinheiten. Bei einem angenommenen Molekulargewicht von 645 für $RP\text{-}s_{III}$ beträgt somit die Differenz der Molekulargewichte 165 bzw. 115.

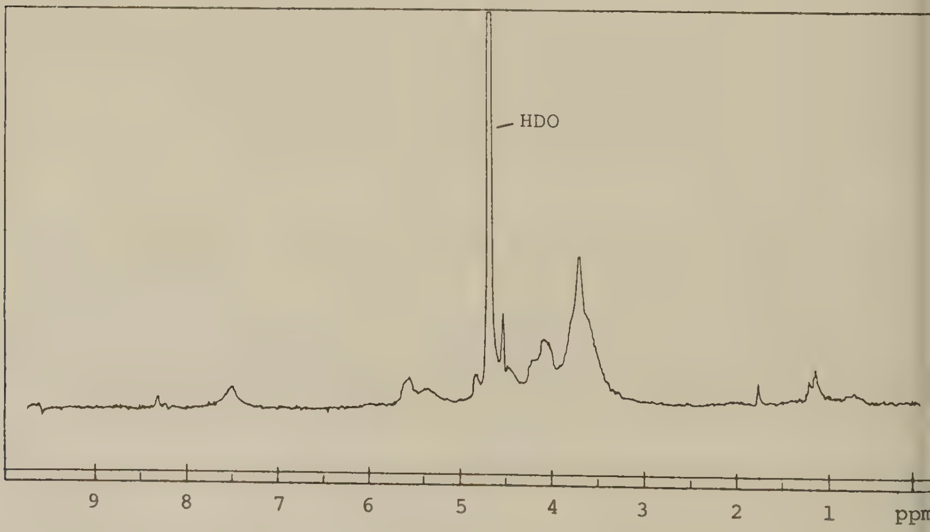
Die beiden gelben Substanzen sind in Wasser gut löslich, dagegen unlöslich in organischen Lösungsmitteln, selbst in Dimethylsulfoxid, Dimethylformamid und Pyridin. Aus diesem Grund konnten die ^1H-NMR.-Spektren nur in D_2O aufgenommen werden, was wegen dem Austausch von NH- und OH-Protonen ungünstig ist; siehe Figuren 20 und 21.

Figur 20: PFT-^{1}H-NMR.-Spektrum von $MnOxg_a$. a)



a) in D_2O

Figur 21: PFT-^{1}H-NMR.-Spektrum von $MnOxg_b$. a)



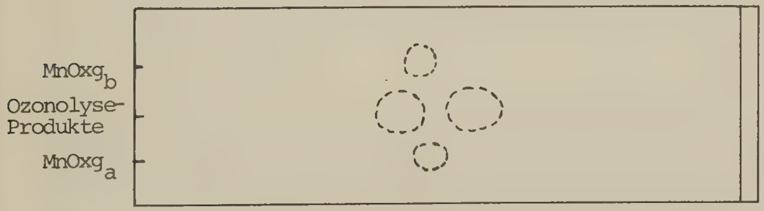
a) in D_2O

Somit konnte man bei beiden gelben Verbindungen nur die CH-Protonen beobachten, und zwar einerseits die Multiplette von Methylen- und Methin-Protonen von Ribosyl- (eventuell Ribityl-)resten zwischen ca. 3 und 5 ppm, anderseits das Anomer-Proton des Ribosylrestes bei 5,57 ppm und ein Methin-Proton eines Heteroaromaten bei 7,5 ppm. Die Signale im Spektrum von $MnOxg_b$ unterhalb 2 ppm könnten von einer Verunreinigung stammen.

Der DC.-Vergleich der gelben Produkte aus $KMnOx_4$-Oxydation und Ozonabbau von $RP\text{-}s_{III}$ (siehe nachstehende Tabelle 10) ergab, dass keines dieser Produkte identisch war.

<u>Tabelle 10:</u>

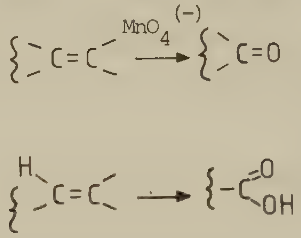
Substanz	DC : CM.-Cellulose LM : H_2O/Py 9:1			DC : Cellulose LM : B/A/W 10:3:5		
	R_f	Farbe	Fluoreszenz UV 350 nm	R_f	Farbe	Fluoreszenz UV 350 nm
Ozonolyse gelbe Produkte	0,35	gelb	hellgelb	0,43 0,55	gelb gelb	hellgelb hellgelb
$MnOxg_a$	0,36	gelb	dunkelgelb	0,47	gelb	dunkelgelb
$MnOxg_b$	0,23	gelb	dunkelgelb	0,46	gelb	dunkelgelb



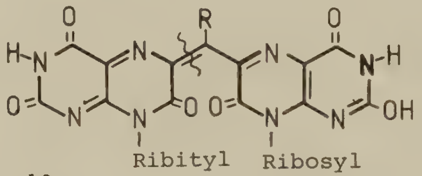
Cellulose in B/A/W 10:3:5

Diskussion der Resultate

Wenn man annimmt, dass durch die Oxydation von RP-s_{III} in jedem Bruchstück 1 bis 2 O-Atome eingetreten sind, nach dem Schema:

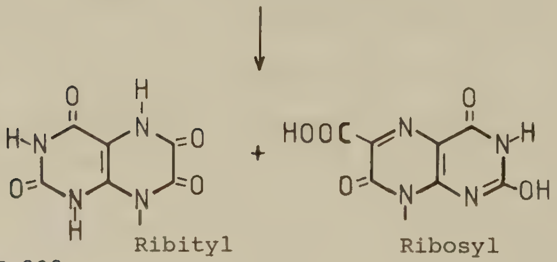


so ergibt sich, dass die $MnO_4^{(-)}$-Oxydation zeigt, dass die bisher postulierte dimere Struktur von RP-s_{III} vermutlich nicht richtig sein kann, zum Beispiel:



R = H MG 636

10



MG 328

4

MG 356

denn keine dieser Verbindungen erreicht ein MG von 481 bzw. 531. Zudem wären diese Verbindungen überhaupt nicht gelb gefärbt. Auch kann die Basizität der gefundenen Produkte nicht mit den postulierten Strukturen für RP-s_{III} in Einklang gebracht werden.

Da für RP-gelb$_I$ und RP-gelb$_{IV}$ bewiesen ist, dass sie eine N-Funktion an C(7) des Lumazingerüstes tragen (siehe Seite 9,10), muss nun auch in Betracht gezogen werden, dass die von (2,4) gefundenen Hydrolyseprodukte (Schema 4) mit O-Funktion an C(7) aus C(7)-Amino- bzw. C(7)-Iminovorstufen entstanden sein könnten. Dann ist auch gar nicht zu erwarten, dass die Oxydationen an RP-s$_{III}$ zur V-Compound (2) bzw. zu den erwarteten Produkten (Seite 57) führen.

Wir versuchten noch, die beiden gelben Verbindungen durch Essigsäure-Bombenrohrhydrolyse in eine der bekannten Substanzen V-Compound (2), 7-Oxo-8-ribityl-7,8-dihydrolumazin (1) und 6,7-Dioxo-8-ribityl-5,6,7,8-tetrahydrolumazin (4) zu überführen. Dabei entstanden mehrere farblose, fluoreszierende Produkte, jedoch konnte keines davon identifiziert werden (siehe exp. Teil, Seite 113).

Unerwartet ist auch die Tatsache, dass die beiden gelben Oxydationsprodukte MnOxg$_a$ und MnOxg$_b$ offensichtlich immer noch einen N-Ribityl- und einen N-Ribosyl-Rest tragen. Unsere Ergebnisse zeigen, dass die bisher postulierten Strukturen für RP-s$_{III}$ modifiziert werden müssen.

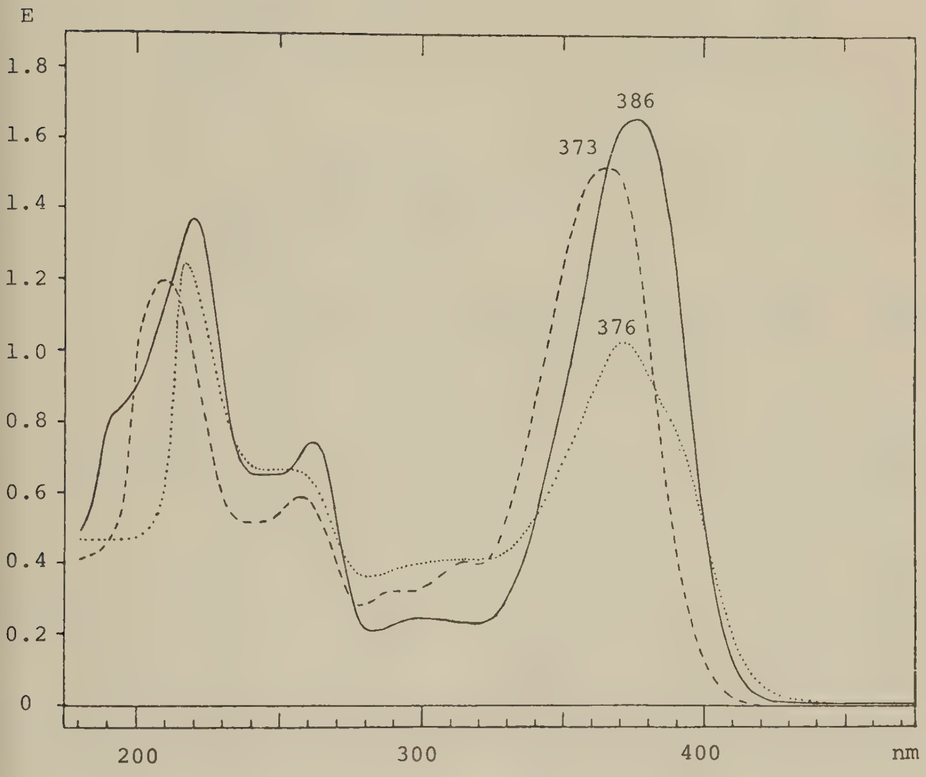
Isolierung und Charakterisierung des farblosen, blau fluoreszierenden Produktes ($MnOx_3$)

Neben den gelben Verbindungen entstanden bei der $KMnO_4$-Oxydation zahlreiche farblose, blau fluoreszierende Produkte. Daraus wurden 5 Verbindungen isoliert, von denen jedoch nur eine Hauptkomponente (= $MnOx_3$) spektroskopisch charakterisiert wurde. Der Verlauf des UV/VIS.-Spektrums (Figur 22) in allen pH-Bereichen ist demjenigen eines Lumazin-Derivates ähnlich; siehe Spektren von RP-$gelb_I$ (5) und RP-$gelb_{IV}$ (6), (6,7). Gegenüber den zwei gelben Verbindungen tritt ein hypsochromer Effekt auf, der auf ein verkürztes konjugiertes System hinweist. Die Ribose-Bestimmung ergab, dass bei $MnOx_3$ ebenfalls eine Ribosylgruppe vorhanden ist.

Im ^1H-NMR.-Spektrum (Figur 23) erscheinen die Ribityl- und Ribosyl-Protonen zwischen 3,2 und 6 ppm. Das Dublett ($J = 6$ Hz) bei 5,60 ppm entspricht dem Anomer-Proton. Die Signale bei 7,24, 10,5 und 11,8 ppm könnten, auf Grund des beobachteten Austausches mit D_2O, NH-Protonen zugeordnet werden. Bei 7,56 ppm ist ein scharfes Singulett zu sehen, das aus einem heteroaromatischen CH-Proton stammen könnte.

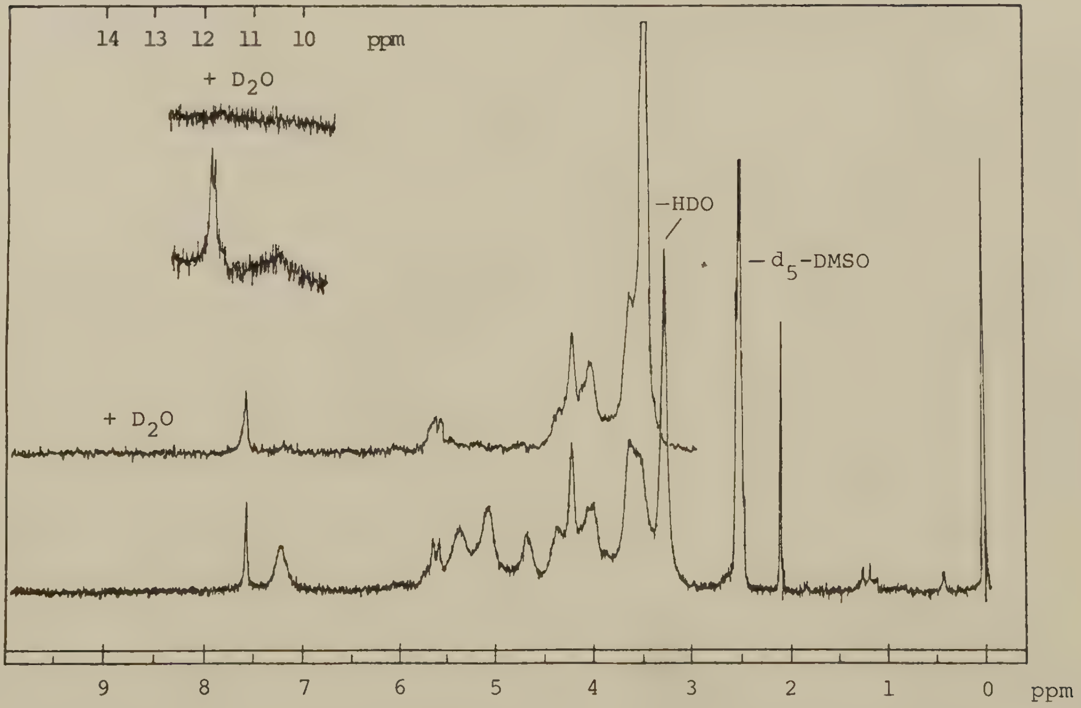
Die Substanz wurde analog zu den beiden Verbindungen in Essigsäure hydrolysiert. Dabei entstand wiederum keine Verbindung, die mit den bereits zur Verfügung stehenden identisch war (siehe Exp. 10).

Figur 22: UV/VIS.-Spektrum von $MnOx_3$ a)



a) ——— H_2O neutral : 0,1875 mg in 5 ml
----- 0,1N HCl : qualitativ
..... 0,1N NaOH : qualitativ

<u>Figur 23:</u> PFT-^{1}H-NMR.-Spektren von $MnOx_3$ in d_6-DMSO und nach Zugabe von D_2O.



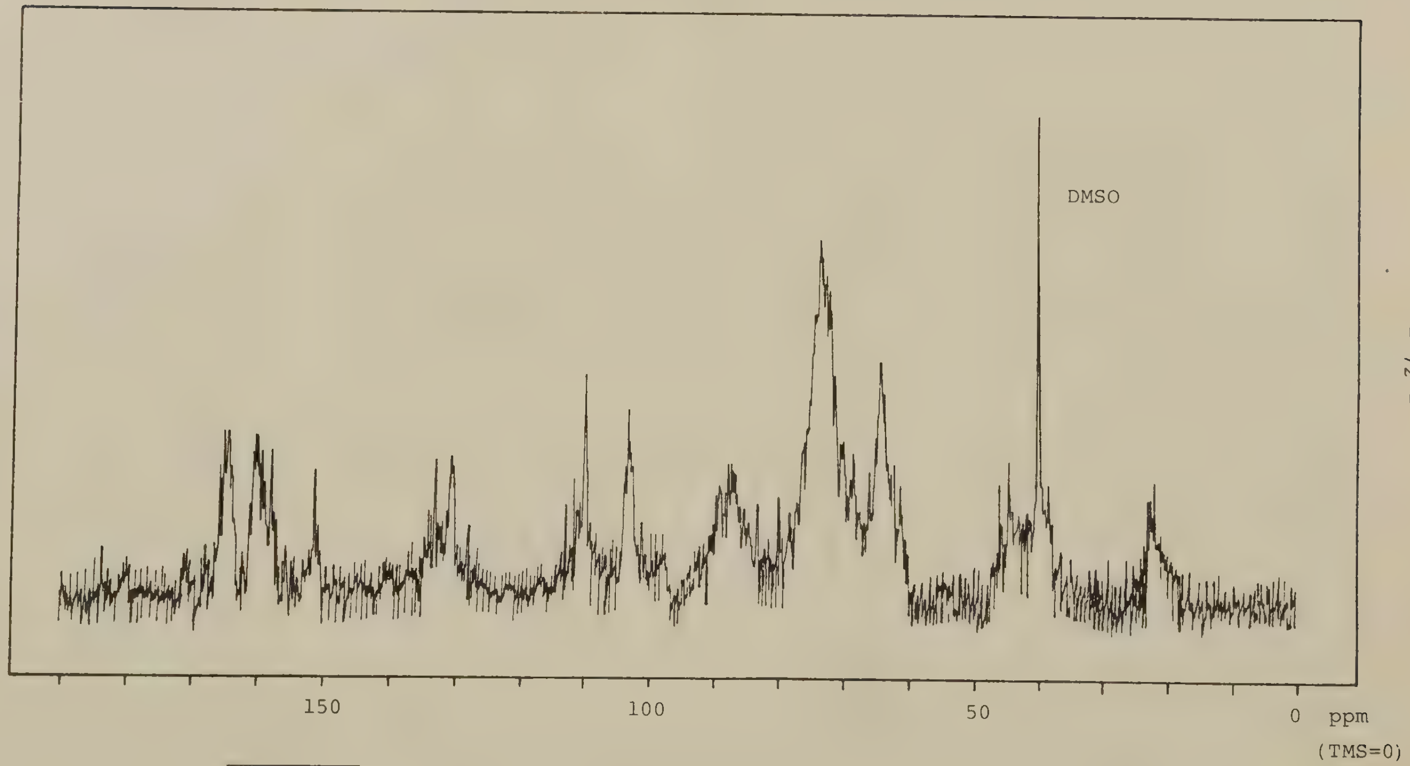
2.6. ^{13}C-NMR.-SPEKTREN VON RP-s_{III} UND $MnOx_3$

Bisher wurde mehrmals versucht, das ^{13}C-NMR.-Spektrum von RP-s_{III} aufzunehmen. Die komplizierte Natur des Moleküls dieses Naturstoffes machte den Versuch schwierig. Die Aufnahme dieses Spektrums mit einer maximalen Konzentration von 250 mg Farbstoff in 1,5 ml D_2O ergab eine Anhäufung von schwer interpretierbaren Piks. Auch das von Ewers (53) und Philipsborn (54) erwähnte Messverfahren der ^{13}C-NMR.-Spektren von Pteridinen in verschiedenen pH-Bereichen war erfolglos. Die Aufnahme des ^{13}C-NMR.-Spektrums von RP-s_{III} in saurem pH ermöglichte eine bessere Auflösung. Bei der Rückgewinnung des Farbstoffes wurden fünf rote Substanzen isoliert, was zeigt, dass RP-s_{III} dabei teilweise zersetzt wurde. Die Interpretation des ^{13}C-NMR.-Spektrums des Abbauproduktes $MnOx_3$ war ebenfalls nicht möglich. Immerhin konnten aus beiden Spektren einige wichtige Schlüsse gezogen werden:

In beiden Spektren sind je zwei Gruppen von Signalen zu sehen. Die eine Gruppe zwischen 42 und 90 ppm enthält die Signale, die von den Kohlenstoffatomen des Ribosyl- und Ribitylteiles hervorgerufen werden. Im Bereich von 100 - 170 ppm erscheinen die Signale, die den Kohlenstoffatomen des Aglykons entsprechen. Wie ein Vergleich mit Literaturwerten ergibt (siehe Tabellen 11, 12, Figur 26), können die drei Multiplette im Bereich von 42 - 90 ppm wie folgt zugeordnet werden:

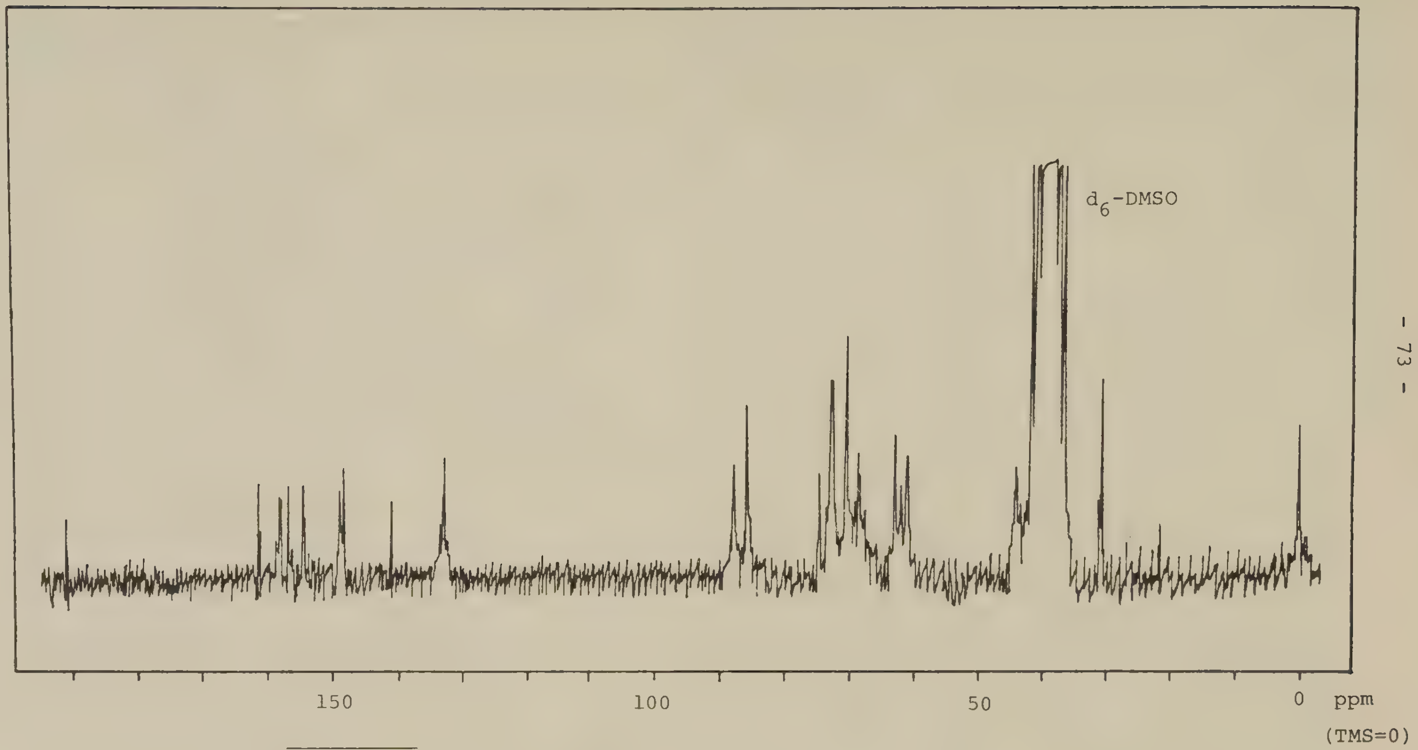
Dasjenige bei 86,6 - 88,5 ppm entspricht den C(4')- bzw. C(1')-Atomen eines N-β-Ribofuranosids, das zwischen 68 - 75 ppm wird von den Kohlenstoffatomen C(2'), C(3') und dasjenige zwischen 62 - 65 ppm vom Kohlenstoffatom C(5') des Ribosyl- und Ribitylrestes hervorgerufen. Bei 45 ppm erscheint das Signal, das dem C(1') des Ribityls entspricht.

Figur 24: PFT-^{13}C-NMR.-Spektrum von Russupteridin-s_{III}.[a)]



a) c = 250 mg in 1,5 ml H_2O

<u>Figur 25:</u> PFT-^{13}C-NMR.-Spektrum von $MnOx_3$. [a)]



a) 7 mg in 0,7 ml d_6-DMSO

Tabelle 11: ^{13}C-NMR.-Resonanzfrequenzen (δ TMS-Werte in ppm) der D-Ribosyl-Gruppe von ausgewählten Nucleosiden und Ribosiden verschiedener Konfigurationen.

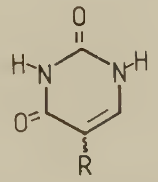
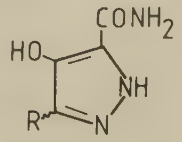
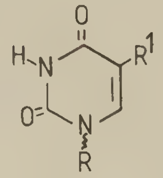
Art des Ribosids	Verbindung	LM/ Stand.	C(1')	C(2')	C(3')	C(4')	C(5')	Lit.
	D-Ribose Furanose α	D_2O / Dioxan	96,55	75,60	70,35	82,75	61,70	55
	D-Ribose Furanose β		101,25	75,60	70,80	83,35	62,90	
	D-Ribose Pyranose α		93,80	70,35	69,60	71,30	67,60	
	D-Ribose Pyranose β		94,15	69,15	67,60	71,30	63,35	
C-Riboside	α-Pseudouridin R = α-D-Ribo-furanosyl 	H_2O / Dioxan	76,60	72,50	72,10	81,30	62,00	56
	β-Pseudouridin R = β-D-Ribo-furanosyl		78,60	72,90	71,30	82,90	61,10	
	Pyrazomycin B R = α-D-Ribo-furanosyl 		74,90	73,20	71,80	81,30	61,10	56
	Pyrazomycin R = β-D-Ribo-furanosyl		75,40	73,80	70,80	84,10	61,10	
O-Riboside	Methyl-α- resp.	H_2O / Benzol	104,60	72,80	72,60	84,00	63,30	57
	-β- D-Ribofuranosid	H_2O / Dioxan	108,00	74,35	70,85	82,95	62,90	55
	Methyl-β- D-Ribo-pyranosid	D_2O / Dioxan	103,85	70,40	69,85	72,65	65,55	55

Tabelle 11: Fortsetzung.

Art des Ribosids	Verbindung	LM Stand.	C(1')	C(2')	C(3')	C(4')	C(5')	Lit.
N-Riboside	Cytidin	DMSO	90,13	75,14*	70,58*	85,38	61,89	58
	R^1 = H, R = α-D-Ribofuranosyl 	d_6-DMSO	85,20	70,60	70,60	84,20	61,30	59
	R^1 = H, R = β-D-Ribofuranosyl		89,10	74,90	71,10	86,00	62.20	
	R^1 = Me, R = α-D-Ribofuranosyl		85,50	70,80	70,80	84,20	61,60	
	R^1 = Me, R = β-D-Ribofuranosyl		87,30	73,80	70,20	85,00	61,50	
	R = β-D-Ribofuranosyl, I) R^1 = OH	DMSO	88,60	74,21*	71,36*	85,88	62,37	58
	R = β-D-Ribofuranosyl, II) R^1 = NH_2		88,67	74,07*	71,56*	85,82	62,72	
	Inosin		88,80	75,20*	71,30*	86,70	62,30	60
	Guanosin		87,30	74,90*	71,60*	86,40	62,20	
	Xanthosin		89,90	74,80*	71,50*	87,30	62,20	
	9-α-D-Ribofuranosyl-theophylin	d_6-DMSO	66,70	71,20	70,60	85,10	61,30	59
	9-β-D-Ribofuranosyl-theophylin		87,70	73,10	69,50	79,40	62,70	
	9-α-D-Ribofuranosyl-adenin		86,10	71,80	71,80	84,90	62,60	
	9-β-D-Ribopyranosyl-adenin	D_2O / Dioxan	81,15	68,60	66,05	70,80	64,95	55
	Adenosin		88,45	74,25	70,25	85,55	61,30	
		d_6-DMSO	89,00	74,60	71,70	86,90	62,70	59

*) Werte nach (55) umgestellt.

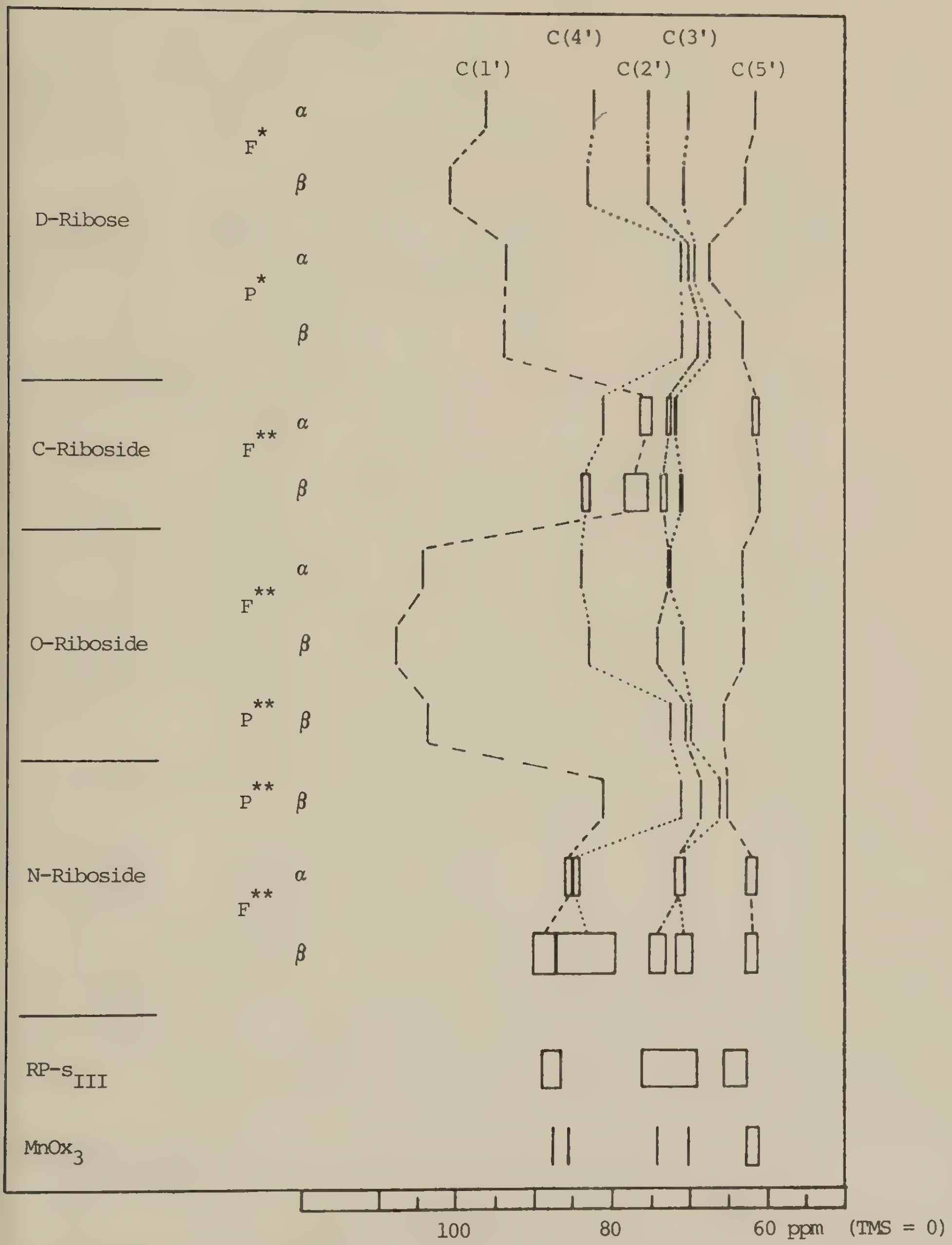
<u>Tabelle 12:</u> ^{13}C-NMR.-Resonanzfrequenzen (δ TMS -Werte in ppm) der Ribosyl-Gruppe verschiedener Riboside. a)

			C(1')	C(1')	C(3')	C(4')	C(5')	Lit.
C-Riboside (Furanoside)		α	75,75±0,85	72,85±0,35	71,95±0,15	81,30	61,55±0,45	56
		β	77,00±1,60	73,35±0,45	71,05±0,25	83,50±0,60	61,10	
O-Riboside (Methyl-Riboside)	Furanoside	α	104,60	72,80	72,60	84,00	63,30	57
		β	108,00	74,35	70,85	82,95	62,90	55
	Pyranosid	β	103,85	70,40	69,85	72,65	65,55	
N-Riboside	Furanoside	α	85,65±0,45	71,20±0,60	71,20±0,60	84,65±0,45	61,95±0,65	59
		β	88,70±1,40	74,10±1,00	70,60±1,10	83,40±3,90	62,00±0,70	57-60
	Pyranosid	β	81,15	68,60	66,05	70,80	64,95	55

---

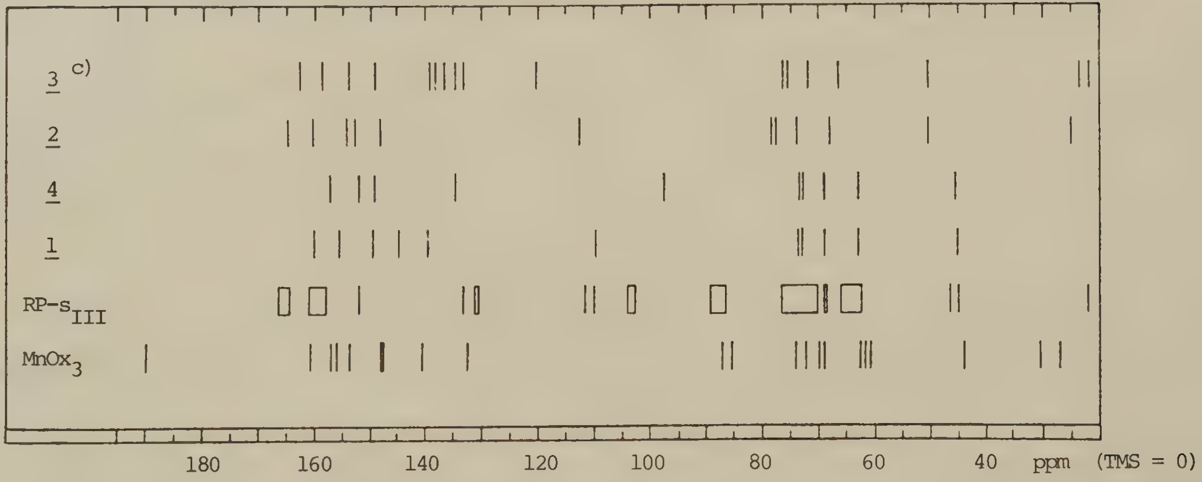
a) vgl. Tabelle 11

Figur 26: Schematische Darstellung der ^{13}C-NMR.-Spektren der D-Ribosyl-Gruppe in verschiedenen Konfigurationen und Ribosiden (siehe Tabellen 11, 12) und ihr Vergleich mit dem entsprechenden Teil der Spektren von RP-s_{III} und $MnOx_3$.



*) F = Furanose, P = Pyranose **) F = Furanosid, P = Pyranosid

<u>Figur 27:</u> ^{13}C-NMR.-Spektren der Neutralmoleküle von RP-s_{III} [a] und $MnOx_3$ [b] sowie verschiedener synthetischer Lumazinderivate [b].



---

a) in H_2O, b) in d_6-DMSO
c) nach (64)

Eine genauere Zuordnung dieser Signale ist im Spektrum von $MnOx_3$ möglich.

Ribosyl-Kohlenstoffatome :
C(1') 87,3 ppm (S), C(2') 74,18 ppm (S), C(3') 70,0 ppm (S), C(4') 85,4 ppm (S), C(5') 60,8 - 62,8 ppm.

Damit ist erstmals bewiesen, dass es sich bei Russupteridin-S_{III} um ein β-Ribofuranosyl-russupteridin handelt (Figur 26).

Ribityl-Kohlenstoffatome:
C(1') 43,9 ppm, C(2') 68,3 ppm, C(3') 72,3 ppm, C(4') 72,5 ppm, C(5') 60,8 - 62,8 ppm.
Die Zuordnung dieser Signale entspricht ebenfalls den in der Literatur für Ribityl-Lumazin-Derivate angegebenen Werten.

Die dem Aglykon entsprechenden Signale könnten von einem Pteridingerüst hervorgerufen werden. Sie liegen im Resonanzbereich der synthetischen Lumazin-Derivate (Figur 27). Eine Zuordnung war allerdings nicht möglich.

2.7. METALLKOMPLEXE VON RP-s_{III}

Im Jahre 1970 berichteten Eugster und Mitarbeiter (3) über das grosse Komplexbildungsvermögen von roten Russulafarbstoffen gegenüber Schwermetall-Ionen. In einem aus R. lepida hergestellten roten Farbstoff-Präparat konnten die Autoren Cu (ca. 1 %) und geringe Mengen von K, Ca, Fe und Zn nachweisen.

Anderseits ist die Komplexbildung mit Schwermetallen von Pteridinen und Flavinen bekannt (61-63).

Auf Grund dieser Tatsachen wurde von mir die Komplexbildung von RP-s_{III} untersucht mit dem Zweck, einen möglichen Weg für seine Kristallisation zu finden. Das Experiment (siehe Seite 115) war positiv mit Zn, Cu, Ni, Ag und negativ mit Cr und Fe. Die Probe von Hg-RP-s_{III} zersetzte sich. Der qualitative Nachweis der entsprechenden Metalle in den Proben Pb-, Ca-, Cd-, Al-, Mn- und Co-RP-s_{III} wurde nicht durchgeführt. Keine der obigen Proben konnte kristallisiert werden.

3. ZUSAMMENFASSUNG

Die bisherigen Kenntnisse über den Farbstoff Russupteridin-s_{III} können wie folgt kurz zusammengefasst werden:

Es handelt sich um ein Pteridin-Ribosid dimerer Natur. Der eine Teil des Moleküls weist ein 8-Ribityl-lumazin ähnliches Gerüst auf. Die darin enthaltene Ribose besitzt eine β-D-Ribofuranosyl-Konfiguration.

Es wurden Versuche durchgeführt, um den ribosehaltigen Teil des Moleküls durch die Herstellung von Derivaten zu identifizieren.

Aus der Hydrolyse und Kaliumpermanganat-Oxydation des Farbstoffes wurden Produkte isoliert, bei denen es sich um Riboside handelt. Ihre Struktur konnte jedoch wegen der kleinen Mengen und dem Mangel an Vergleichssubstanzen nicht aufgeklärt werden.

Auf Grund dieser Derivate sollte eine Ueberprüfung der von (2,4) postulierten Strukturmöglichkeiten für Russupteridin-s_{III} vorgenommen werden.

4. VERDANKUNGEN

Ich möchte allen herzlich danken, die mich durch ihre Hilfe in meiner Arbeit unterstützt haben, insbesondere

Herrn Prof. Dr. W. Pfleiderer, Universität Konstanz, für Substanzproben.

Herrn Prof. Dr. W. von Philipsborn und seinen Mitarbeitern, den Herren dipl. chem. W. Schwotzer und W. Städeli, für die Messung zahlreicher NMR.-Spektren.

Herrn Prof. Dr. S. Matsuura, Nagoya University, Japan, für Substanzproben.

Herrn Dr. P.X. Iten für seine Bereitschaft, mir bei auftretenden Problemen behilflich zu sein, sowie für die Ueberlassung der IR.- und NMR.-Spektren von RP-s_{III}.

Herrn H. Frohofer für die Aufnahme des IR.-Spektrums des acetylierten RP-s_{III}.

Herrn Prof. Dr. H.R. Oswald, Anorganisches Institut Universität Zürich, für die Zurverfügungstellung des Atomabsorptions-Spektrometers.

Dem Schweizerischen Nationalfonds für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

IV EXPERIMENTELLER TEIL

1. ALLGEMEINES

- Spektren: UV/VIS.-Spektren wurden am BECKMANN-ACTA III, IR.-Spektren am PERKIN-ELMER Spektrographen (Modell 257 mit Gitteroptik), CD.-Spektren an einem ROUSSEL-JOUAN Dichrographen (Modell 185) und ^{1}H-NMR.-Spektren von RP-s_{III} und seiner acetylierten Verbindung auf einem VARIAN HA-100 (MHz) Spektrometer mit Tetramethylsilan als internem Standard gemessen. Die Aufnahme der restlichen ^{1}H-(100 MHz)- und ^{13}C-NMR.-(25,2 MHz)-Spektren erfolgte an einem Gerät VARIAN XL-100-15-Spektrometer, ausgerüstet mit einer Puls-Fourier-Transformeinheit und einem 620L-16K-Computer. Die chemischen Verschiebungen sind in ppm relativ zu TMS = 0 angegeben (δ-Werte).

  Die spektroskopischen Daten werden wie folgt angegeben: UV/VIS.: $\lambda_{max.}$ (nm) (E), [ ] = Schulter; IR.: s = stark, m = mittel, w = schwach; NMR.: S = Singulett, D = Dublett, Q = Quintett, M = Multiplett, J = Kopplungskonstante.

- Chromatographie: Zur analytischen Dünnschichtchromatographie wurden Fertigfolien der Firma MACHERY-NAGEL & Co. verwendet (CEL 300 UV_{254}, CEL 300 CM und SIL N-HR/UV_{254}). Für die Säulenchromatographie wurden folgende Materialien verwendet: WHATMAN CF 11 Cellulosepulver; SEPHADEX G-25 und G-15 der Firma PHARMACIA, Uppsala (Schweden); DEAE-SS-Cellulose von SERVA, Heidelberg; Kieselgel MERCK 60 für die präparative Schichtchromatographie. Als UV.-Detektor wurde ein LKB UVICORD II, Typ 8301 A, benützt.

- <u>Ozonabbau:</u> Für den Ozonabbau wurde ein Ozonisator WELSBACH (Modell T-23) verwendet.

- <u>Atomare Absorptionsanalyse:</u> Diese Analyse wurde mit einem Spektrometer der Firma UNICAM (Modell SP 90A) durchgeführt.

- <u>Ribose-Bestimmung:</u> Sie wurde, wo nicht anders erwähnt, nach der Orcin-Methode (vgl. Exp. 5.1.) durchgeführt.

Bei der Isolierung von Russupteridin-s_{III} und den mit diesem Farbstoff durchgeführten Experimenten wurde darauf geachtet, dass keine direkte Lichteinwirkung erfolgte. Das verwendete Wasser wurde entionisiert und anschliessend in einer Pyrexapparatur destilliert.

Es wurden folgende Abkürzungen verwendet:

RP	=	Russupteridin
R.	=	Russula
DC	=	Dünnschichtchromatographie
PC	=	Papierchromatographie
GC	=	Gaschromatographie
MeOH	=	Methanol
AcOH	=	Essigsäure
Py	=	Pyridin
Nactr	=	Natriumcitrat
DMF	=	Dimethylformamid
AcONa	=	Natriumacetat
d_6-DMSO	=	Hexadeutero-dimethylsulfoxid
LM	=	Laufmittel bzw. Lösungsmittel
B/A/W	=	n-Butanol/Essigsäure/Wasser
Z.T.	=	Zimmertemperatur
Subst.	=	Substanz

2. WEITERE REINIGUNG DES PILZ-EXTRAKTES ISOLIERUNG VON RP-s_{III}

Der aus 165 kg frischen Fruchtkörpern von R.sardonia, Ernte 1970, Herkunft Schwarzwald, nach (4) erhaltene Pilzextrakt wurde wie folgt weiter gereinigt. Er wurde zunächst durch eine Glasfritte G4 filtriert und das Filtrat abgedampft, das anschliessend in drei Teilen folgendermassen chromatographiert wurde:

Es wurde zuerst mit einer 5,5 kg Cellulose-Säule (43 x 20 cm, Whatman CF 11) und bidest. H_2O ausgewaschen. Danach wurde der Farbstoff mit 1proz. Pyridin chromatographiert, wobei sich zunächst eine kleine rote Zone, dann eine rote Hauptzone und schliesslich noch eine kleine rote Zone trennten.

Die Hauptzone wurde weiter an einer Sephadex-Säule G-25 (120 x 20 cm) chromatographiert. Sie wurde zuerst mit 15 l bidest. H_2O ausgewaschen, wobei blau fluoreszierende, farblose Stoffe wanderten. Der Farbstoff wurde hierauf mit 1proz. Pyridin eluiert, die Lösung eingeengt, mit einer Glasfritte G4 abfiltriert und der Farbstoff durch Zugabe von MeOH zur konz. wässrigen Lösung ausgefällt und abzentrifugiert.

So erhielt man 280 mg reines RP-s_{III}.

3. ACETYLIERUNG VON RP-s_{III}

3.1. Verfolgung des zeitlichen Reaktions-Ablaufes

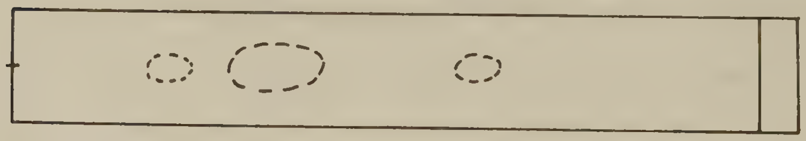
1 mg RP-s_{III} wurde in 2,5 ml trockenem Pyridin und in 2,5 ml trockenem DMF gelöst. Dazu tropfte man 2,5 ml Essigsäureanhydrid zu und liess bei Zimmertemperatur rühren. Der Reaktionsablauf wurde dünnschichtchromatographisch verfolgt (Polygram-Kieselgel). LM $CHCl_3$/MeOH 9:1.

Ergebnisse siehe Figur 1.

3.2. Präparativer Ansatz

5 mg RP-s_{III} wurden in 12,5 ml trockenem Pyridin und in 12,5 ml DMF bei Z.T. gelöst. Dazu tropfte man unter Rühren 12,5 ml Essigsäureanhydrid zu und liess 40 Min. bei Z.T. stehen. Die Farbe der Lösung änderte sich in dieser Zeit nicht. Die rote Lösung wurde bei vermindertem Druck (1 Torr, 35°) abgedampft.

Das Dünnschichtchromatogramm auf Kieselgel (LM $CHCl_3$/MeOH 9:1) zeigte die Entstehung von drei Produkten:



Der violette Rückstand wurde anschliessend in Chloroform gelöst und an einer Kieselgel-Säule chromatographiert (Merck; 60 für die präparative Schicht-Chromatographie, Elutions-Mittel $CHCl_3$/MeOH 20:1).

Analog wurden noch 15 mg RP-s_{III} acetyliert.

Aus beiden Ansätzen wurden 19,4 mg Hauptprodukt isoliert, das anschliessend durch Umfällen aus $CHCl_3$ mit Pentan weiter gereinigt wurde. Von diesem Produkt wurden UV.-, IR.- und NMR.-Spektren gemessen.

IR.-Spektrum des acetylierten RP-s_{III} in $CHCl_3$:

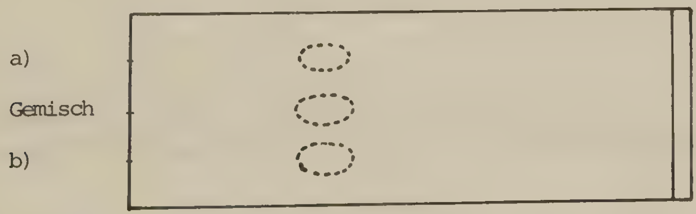
3140 cm^{-1} (w), 2960 cm^{-1} (w), 1750 cm^{-1} (s), 1660 cm^{-1} (m), 1610 cm^{-1} (m), 1578 cm^{-1} (s), 1520 cm^{-1} (w), 1425 cm^{-1} (w), 1375 cm^{-1} (m), 1330 cm^{-1} (w), 1290 cm^{-1} (m), 1240-1210 cm^{-1} (s), 1100-1050 cm^{-1} (m), 970 cm^{-1} (w), 904 cm^{-1} (w), 865 cm^{-1} (w), 820 cm^{-1} (w).

3.3. Acetylierung von RP-s_{III} mit Ac_2O und AcONa

0,4 mg RP-s_{III}, 1 ml Ac_2O und 75 mg AcONa wurden gemischt und bei Z.T. unter Rühren stehen gelassen. Die Reaktion wurde mit DC (Kieselgel; $CHCl_3$/MeOH 9:1) verfolgt. Resultate siehe Figur 6.

Die Reaktion ergibt die gleichen Produkte wie bei Acetylierung mit Ac_2O in Pyridin und DMF, sie verläuft aber viel langsamer.

Nach 4 Tagen wurde die Lösung abgedampft und das Reaktionsgemisch an Kieselgel mit $CHCl_3$/MeOH 20:1 chromatographiert. Nach einer sehr guten Trennung wurde das Hauptprodukt[a)] isoliert, das nach DC-(Kieselgel; $CHCl_3$/MeOH 9:1)Vergleich identisch ist mit dem Hauptprodukt[b)] der Acetylierung in 40 Min. mit Ac_2O, Pyridin und DMF.



4. para-BROMBENZOYLIERUNG VON RP-s_{III}

1 mg RP-s_{III} wurde in 3 ml trockenem Pyridin gelöst und danach 1 mg frisch sublimiertes p-Brombenzoylchlorid zugegeben. Nach 24 Std. Rühren bei Z.T. wurde nochmals 1 mg p-Brombenzoylchlorid zugefügt. DC Cellulose; B/A/W 10:3:5 und H_2O/Py 9:1 zeigten, dass violett-farbige Produkte entstanden waren. Nach 48 Std. wurde die Reaktion durch Zugabe von 6 ml H_2O beendet. Die Lösung wurde 4 Std. weiter gerührt und schliesslich nach der Zugabe von 2 mg $KHCO_3$ abgedampft. Danach wurde Essigester und Wasser zugegeben und der organische und wasserlösliche Teil der Reaktion mehrmals extrahiert. Die Essigester-Phase färbte sich schwach rot, während die wässrige Phase das nicht reagierte RP-s_{III} enthielt. Zurück aus der Extraktion blieb ein in Wasser und Essigester unlösliches, tiefrotes Produkt, das in Aceton und MeOH schwach löslich, sehr gut aber in Pyridin, mit einer intensiven violett-roten Farbe, löslich war.

Den Beweis, dass es sich um ein p-Brombenzoyl-Derivat handelt, gibt das UV/VIS.-Absorptionsspektrum in MeOH, das ein für den p-Brombenzoylrest charakteristisches Maximum bei 246 nm zeigt.

5. RIBOSE-BESTIMMUNG

5.1. Orcin-Methode

Vorbereitung der Messlösung:
1 ml der zu untersuchenden Lösung, 0,15 ml der Orcin-Lösung und 2,5 ml der $FeCl_3 \cdot 6H_2O$-Lösung wurden in einem 5 ml Messzylinder zusammengemischt. Die Lösung wurde bei 100° (Wasser-

bad) während 20 Min. erwärmt. Dabei färbte sie sich langsam grün. Anschliessend kühlte man auf Z.T. ab und füllte mit Wasser auf 4 ml auf. Analog und gleichzeitig wurde die Referenzlösung vorbereitet. Anstatt der zu untersuchenden Lösung wurde 1 ml H_2O zugesetzt. Das VIS.-Absorptionsmaximum wurde bei 668 nm gemessen.

Lösungen: a) Die zu untersuchende Lösung, welche 1-20 μg Ribose pro ml enthält.

b) 0,02proz. $FeCl_3 \cdot 6H_2O$ (Merck z.A.) in konz. HCl (Merck z.A. 32proz.).

c) 10proz. Orcin (nach Sublimation von Orcin-Monohydrat Fluka bei 80° und 0,05 mm Hg) in absolutem Aethanol.

5.2. Cys·HCl-Methode

Vorbereitung der Messlösung:
1 ml der zu untersuchenden Lösung, 5 ml konz. H_2SO_4 und gleich danach 0,05 ml Cys·HCl-Lösung wurden gemischt. Nach 20 Min. bei Z.T. war die Reaktion beendet, und die Lösung färbte sich langsam gelb. Sie blieb während 2 Std. stabil.

Analog und gleichzeitig wurde die Referenzlösung vorbereitet, wobei anstatt der Cys·HCl-Lösung 0,05 ml H_2O zugesetzt wurden. Das VIS.-Absorptions-Spektrum wurde 30 Min. nach der Addition der Cys·HCl-Lösung bei 392 nm gemessen.

Lösungen: a) Die zu untersuchende Lösung, die 6-100 μg Ribose enthält.

b) Konz. H_2SO_4 (Merck z.A.).

c) 5proz. wässrige Cysteinhydrochlorid-Lösung.

Es wurde beobachtet, dass der Chromophor von RP-s_{III} unter diesen Reaktionsbedingungen stabil ist, was sich durch eine wiederholte Messung und Vergleich mit der Referenzlösung aus 1,05 ml H_2O und 5 ml H_2SO_4 zeigen liess (siehe Figur 10).

Eine Vermutung, dass bei der Einwirkung von H_2SO_4 auf RP-s_{III} die Ribose abgespalten wird, wurde durch folgendes Experiment bestätigt.

6. BEARBEITUNG VON RP-s_{III} MIT H_2SO_4

Man liess eine Lösung von 2 mg RP-s_{III} in 2 ml H_2O mit 10 ml konz. H_2SO_4 bei Z.T. und unter Rühren während 2 Std. reagieren. Danach wurde die Lösung bei 0^o mit 178 ml 8proz. NaOH neutralisiert, eingeengt und an Cellulose-Säule mit H_2O chromatographiert. DC Cellulose; H_2O/Py 9:1 zeigte, dass 2 rote Produkte mit folgenden R_f-Werten vorhanden waren: 0,42 (Hauptprodukt), 0,82. Die Referenz RP-s_{III} hatte den R_f-Wert 0,20. Das Produkt wurde weiter an Sephadex G-25 mit H_2O chromatographiert, wobei sich 2 rote Zonen unterscheiden liessen. Die qualitative Ribose-Bestimmung (Orcin-Methode) jeder einzelnen Zone war negativ. Es wurden von jeder Zone UV/VIS.-Spektren in H_2O gemessen, die jenem von RP-s_{III} ähnlich waren (siehe Figur 11).

7. DRUCKHYDROLYSE VON RP-s_{III}

7.1. H_2O-Hydrolyse 50 mg RP-s_{III}

50 mg RP-s_{III} wurden in 50 ml bidest. H_2O gelöst und diese Lösung auf 25 Pyrex-Bombenrohre verteilt, anschliessend sorgfältig eingefroren und durch mehrmaliges Evakuieren am Hochvakuum, Auftauen und erneutes Einfrieren entgast und abgeschmolzen. Hierauf erfolgte die Hydrolyse während 4 Std. bei 150^{o} im Oelbad. Das gesamte orange-rote, blau fluoreszierende Hydrolysat enthielt schwer löslichen roten Farbstoff, von dem es durch Zentrifugieren abgetrennt wurde. Dieser Farbstoff (ca. 10 mg) war unlöslich in H_2O, DMSO, MeOH und Aceton, löslich aber in CF_3COOH. Das klare Zentrifugat wurde an 110 g DEAE-Cellulose-Säule (50 x 4 cm) chromatographiert. Es wurde zunächst mit bidest. H_2O ausgewaschen und dann mit einem Essigsäuregradienten eluiert. Im UV_{350nm} wurden dabei 14 fluoreszierende Zonen beobachtet (Zonen 1-14). Die gelbliche, grün-blau fluoreszierende Z_1 und die blau fluoreszierenden Z_2 und Z_3 wurden mit H_2O eluiert. Die gelbbraune, blau fluoreszierende Z_4 und die Z_5, Z_6, Z_7 mit Blaufluoreszenz wurden mit 0,1proz. Essigsäure, die orange-farbige Z_8 mit 0,2proz., die blau fluoreszierende Z_9 mit 0,3proz., die hellblaue Z_{10} mit 0,5proz., die orange-farbige Z_{11} mit 1proz., die blau fluoreszierende Z_{12} mit 5proz. und die gelb-grün und hellblau fluoreszierenden Z_{13} und Z_{14} mit 10proz. Essigsäure eluiert.

Die einzelnen Zonen wurden durch Chromatographie an Sephadex G-15 (H_2O) mit Hilfe des UV.-Detektors Uvicord II (LKB) weiter gereinigt. Nur die Zonen Z_1, Z_{10} und Z_{12} waren mit UV_{350nm}-Licht sichtbar. Jede der Zonen Z_4, Z_6, Z_9 und Z_{12} liess sich weiter in zwei Zonen trennen. Die Menge jeder Zone lag im Bereich einiger μg bis 1 mg.

Tabelle 13: Wasser-Hydrolyse von 50 mg RP-s_{III}.

Subst.	DC-Cellulose			Rib. Best.	Qualitative UV.-Spektren (H_2O)
	4proz. Nactr	B/A/W 5:3:5	FF *)		$\lambda_{max.}$ (nm) (E)
Z_1	0,74	0,67	GB	+	196(1,360) 262(0,810) [321(0,250)] 397(0,160
Z_2	0,17	0,72	B	+	207(2,600) 262(1,456) [325(0,760)]
Z_3	0	0	B	-	200(2,600) 264(0,865) [318(0,356) 415(0,08
Z_{4a}	0	0,61	B	+	200(2,430) [223(1,890)] 259(2,895) [300(0,870 [410(0,105)]
Z_{4b}				+	195(1,716) 261(1,007) [323(0,326)] 415(0,100
Z_5	0,35	0,46	B	-	193(0,790) [228(0,530) 272(0,245) 322(0,180
Z_{6a}	0,68	0,48	B	+	195(1,500) [235(0,720)] 262(0,640) 309(0,600
Z_{6b}				-	195(1,760) 239(0,869)
Z_7	0,48	0,45	B	-	193(1,144) 265(0,380) 302(0,380)
Z_8	0,09	0,24	Or	+	195(1,260) 243(0,803) 283(0,565) 488(1,370
Z_{9a}	0,12	0,56	B	-	198(1,990) 283(1,034)
Z_{9b}				+	195(1,440) 264(0,442) 493(0,174)
Z_{10a}	0,50	0,55	HB	+	205(2,265) [264(0,740)] 303(1,036) 335(0,77
Z_{10b}				-	197(1,030) 302(0,390) 343(0,326)
Z_{11}	0,73	0,54	B	+	203(3,0) 263(1,923)
Z_{12a}	0,61	0,60	B	-	214(2,098) [257(0,536)] 284(0,852) 347(0,96
Z_{12b}				-	194(0,815) [265(0,198) 290(0,175)] 456(0,19
Z_{13}	0,26	0,35	HB	-	193(1,260) [267(0,260)] 421(0,120)
Z_{14}	0,26	0,25	HB	-	194(1,340) 197(1,346) 212(1,209) 275(0,52 389(0,408)

*) FF = Fluoreszenzfarben UV_{350} : GB = grün-blau, B = blau, Or = orange, HB = hellblau

<u>Tabelle 14:</u> PFT-^{1}H-NMR.-Spektren (in D_2O) der Wasser-Hydrolyse von 50 mg RP-s_{III}.

Subst.	δ (ppm)
Z_1	6,92(S) 6,12(S) 4,60-3,60(M) 1,92(D) (J = 6 Hz)
Z_2	4,80-3,40(M) 2,40(S) 1,84(S)
Z_3	4,60-3,80(M) 2,40(S) 1,86(S)
Z_{4a}	4,90-3,60(M) 2,00-1,60(M)
Z_5	4,50-3,20(M)
Z_{6a}	4,80-3,80(M) 1,86(M)
Z_{6b}	8,14(S) 1,86(S)
Z_7	6,13(S) 5,80-5,50(M) 4,40-3,80(M) 1,96-1,60(M)
Z_8	10,74(S) 7,83(S) 7,22(S) 5,80-4,00(M) 3,10-2,00(M) 1,9(S) 1,40-1,00(M) *)
Z_{9a}	4,30-3,60(M) 2,90(S) 1,60(S)
Z_{9b}	5,82(S) 4,60-3,60(M) 2,66(S) 2,00-1,40(M)
Z_{10a}	4,70-3,80(M) 2,00-1,40(M)
Z_{10b}	4,40-3,80(M) 1,78(S)
Z_{11}	4,60-3,60(M) 3,10-2,60(M) 1,92(D) (J = 7 Hz)
Z_{12a}	4,90-3,80(M) 1,78(S)
Z_{12b}	7,76(S) 7,41(S) 5,59(S) 1,19(S)
Z_{13}	7,96(S) 2,34(S) 1,76(S)
Z_{14}	4,50-3,80(M) 2,46(S) 1,87(S)

*) in d_6-DMSO

Tabelle 13 zeigt die Daten der Dünnschichtchromatographie, Ribose-Bestimmung und UV.-Spektroskopie der 19 isolierten Verbindungen. Die Daten der PFT-^{1}H-NMR.-Spektren sind in der Tabelle 14 zusammengestellt. Diese Spektren sind in Mikrozelle gemessen.

7.2. H_2O-Hydrolyse 100 mg RP-s_{III}

Analog zur Hydrolyse von 50 mg RP-s_{III} wurden 100 mg RP-s_{III} in 50 ml bidest. H_2O während 4 Std. bei 150^{o} unter Luftausschluss in 26 Pyrex-Bombenrohren hydrolysiert. Die DEAE-Cellulose-Säulen (17,5 x 3,5 cm)-Chromatographie des abzentrifugierten Hydrolysates gab mit Wasser die Zonen Za, Zb und Zc und anschliessend mit 0,1proz. AcOH die gelbbraun gefärbte Zone Zd und die blau fluoreszierende (farblose) Zone Ze, mit 0,5proz. AcOH die orange-farbige Zone Zf, mit 1proz. AcOH die blau fluoreszierende Zone Zg und mit 5proz. AcOH die hellblaue Zone Zk.

Die nachfolgende Chromatographie der blau fluoreszierenden Zone Zg an Sephadex G-15 (Kontrolle mit Uvicord II), LM Wasser, zeigte, dass diese Zone aus 3 verschiedenen Substanzen zusammengesetzt ist. Es konnten eine blau fluoreszierende Hauptzone Zg und zwei kleinere Zonen, eine gelbliche und eine orange-farbige, isoliert werden.

Analog wurde auch die blau fluoreszierende Zone Z_e gereinigt. Sie liess sich zu einer hellblau fluoreszierenden kleinen Zone Ze_1 und zu der blau fluoreszierenden Hauptzone Ze_2 auftrennen.

UV.-, NMR.-, DC.-Daten und die Ribose-Bestimmung an der Substanz aus den Zonen Zg und Ze_2 siehe Tabelle 15.

<u>Tabelle 15:</u> UV.-und PFT-^{1}H-NMR.-Daten sowie Ribose-Bestimmung (Orcin-Methode) von Ze_2 und Zg.

Subst.	Lösungs-mittel	Ribose-Best.	Qual. UV.-Spektren $\lambda_{max.}$ (nm) (E)	PFT-^{1}H-NMR.-Spektren (D_2O)
Ze_2	H_2O	+	205(1,959) 264(1,025) [299(5,40)] [350(0,260)]	8,03(S) 6,07(D) J = 6 Hz 5,21 HDO 4,90-4,00(M) 3,04(S) 2,00-1,60(M)
	0,1N HCl		205(1,604) 265(0,829) [290(0,540)] [355(0,200)]	
	0,1N NaOH		218(1,710) 260(1,040) [298(0,470)] 353(0,265)	
Zg	H_2O	-	214(1,894) [258(0,420)] 286(0,642) 348(0,780)	5,26(S) HDO 4,87(M) 4,68(M) 4,22(M) 1,91(M)
	0,1N HCl		204(1,430) 278(0,707) 331(0,613)	
	0,1N NaOH		218(1,723) 261(0,814) [284(0,388)] 362(0,814)	

7.3. Essigsäure-Hydrolyse 10 mg RP-s_{III}

10 mg RP-s_{III} wurden in 10 ml 2proz. Essigsäure (Merck p.A.) gelöst und diese Lösung in ein Pyrex-Bombenrohr gegeben, anschliessend sorgfältig eingefroren und durch mehrmaliges Evakuieren am H.V., Auftauen und erneutes Einfrieren entgast und abgeschmolzen. Hierauf erfolgte die Hydrolyse während 2 1/2 Std. bei 150° im Autoklaven. Das gesamte, orangerote, blau fluoreszierende Hydrolysat enthielt schwer löslichen, roten Farbstoff, der durch Zentrifugieren abgetrennt wurde. Nach Abdampfen und Trocknen des Hydrolysates in H.V. wurde es weiter an einer DEAE-Cellulose-Säule (25 x 3,5 cm) und dann mit einem Essigsäuregradienten eluiert. Im UV_{350} wurden dabei 9 fluoreszierende Zonen beobachtet (Zonen V_1 - V_9). Die grünblau und die schwachblau fluoreszierenden Zonen V_1 und V_2 wurden mit Wasser eluiert. Mit 1proz. AcOH wurden die blau- und die hellblau fluoreszierenden Zonen V_3 und V_4, mit 3proz. AcOH die orange-farbige, blau fluoreszierende Zone V_5, mit 5proz. AcOH die Zone V_6 mit Blaufluoreszenz, mit 10proz. AcOH die blau- und die hellblau fluoreszierenden Zonen V_7 und V_8 und schliesslich mit 20proz. AcOH die letzte, hellblau fluoreszierende Zone V_9 eluiert.

Anschliessend wurden die einzelnen Zonen, ausser V_5 und V_6, an einer Sephadex G-15-Säule mit Hilfe von Uvicord II chromatographiert.

Die V_1 liess sich mit H_2O weiter in 3 Zonen (V_{1a}, V_{1b}, V_{1c}) trennen. Die V_2 gab mit H_2O die Zone V_{2a} und mit 1proz. AcOH die Zonen V_{2b} und V_{2c}. Die V_5 bestand aus einer in Wasser löslichen (V_{5b}) und einer in Wasser unlöslichen (V_{5c}) Substanz (Resultate siehe Tabelle 16).

Säulen-Chromatographie					Ribose-Bestimmung	Qualitative UV.-Spektren LM H_2O	
DEAE-Cellulose			Sephadex G 15				
Zone	LM % AcOH in H_2O	Fluoresz. UV_{350}	Zone	LM % AcOH in H_2O	Orcin-Methode	$\lambda_{max.}$ (nm) · (E)	$\lambda_{min.}$ (nm) · (E)
V_1	0	grünblau	V_{1a}	0	+	199 (1,630) 268 (0,839) [320 (0,220)] 400 (0,163)	246 (0,662) 300 (0,250) 360 (0,126)
			V_{1b}	0	+	200 (1,840) 244 (1,167) 273 (0,970) 325 (0,347) 362 (0,225)	222 (0,979) 266 (0,945) 300 (0,293) 355 (0,194)
			V_{1c}	0	+	196 (1,268) 224 (0,676) 267 (0,924)	214 (0,592) 242 (0,488)
V_2	0	schwach-blau	V_{2a}	0	-	197 (1,255) [228 (0,430)] 271 (1,841)	241 (0,420)
			V_{2b}	1	-	202 (1,639) 271 (1,639)	232 (0,440)
			V_{2c}	1	-	194 (0,614) 264 (0,156) [328 (0,060)]	242 (0,100)
V_3	1	blau	V_3	1	-	195 (1,284) 258 (0,715) [312 (0,297)]	237 (0,470)
V_4	1	hellblau	V_4	1	-	195 (0,875) [268 (0,170)]	250 (0,183)
V_5	3	blau	V_{5a}	0	-	197 (1,320) [271 (0,270)]	
			V_{5b}	0	-	196 (1,097) 260 (0,286) 323 (0,217)	243 (0,255) 292 (0,166)
			V_{5c}	0	-	189 (0,145) 201 (0,105) 238 (0,068) 283 (0,050) 488 (0,145)	196 (0,1) 222 (0,065) 265 (0,045) 375 (0,010)
V_6	5	blau	V_6	0	-	[192 (0,720)] 211 (0,952) 291 (0,410) 346 (0,369)	265 (0,196) 315 (0,240)
V_7	10	blau	V_7	0	-	192 (0,760) 212 (0,890) 257 (0,229) 286 (0,273) 348 (0,299)	198 (0,725) 247 (0,225) 264 (0,221) 305 (0,132)
V_8	10	hellblau	V_8	0	-	190 (0,450) [272 (0,100)]	
V_9	20	hellblau	V_9	0	-	200 (1,640) [280 (0,250)]	

<u>Tabelle 17:</u> DC-Vergleich der Hydrolyseprodukte von RP-s_{III} (Z_{12a}, Zg, V_7, Ze_2) mit bekannten Lumazinen.

Sub. Nr.	Cellulose					DEAE-Cellulose		Fluoresz. UV_{350nm}
	4proz. Nactr	B/A/W				5proz. AcOH	4proz. Nactr	
		5:3:5	10:3:5	10:5:5	5:10:5			
<u>2</u>	0,58	0,64	0,39	0,47				B
<u>1</u>	0,61	0,60	0,30	0,38	0,39	0,21	0,51	B
<u>15</u>	0,58	0,56	0,27	0,35				B
<u>16</u>	0,66	0,57	0,25	0,32				B
<u>14</u>		0,67	0,43					B
<u>13</u>		0,63	0,35					B
<u>4</u>			0,22					HB
Z_{12a}	0,61	0,60	0,30		0,39	0,23	0,54	B
Zg	0,61	0,60	0,30					B
V_7			0,30					B
Ze_2			0,26					HB

Fluoreszenzfarben: B = blau, HB = hellblau

<u>Tabelle 18:</u> UV.-Spektren-Vergleich mit Lumazinen, die ein zu Z_{12a} ähnliches Chromophorsystem besitzen.

Substanz Nr.	LM	c mg/in 5 ml LM	$\lambda_{max.}$ (nm) (E)	$\lambda_{min.}$ (nm) (E)
<u>1</u>	H_2O	0,12	348(0,784) 286(0,584) 261(0,333) 214(1,621)	303(0,200) 265(0,325) 242(0,253)
<u>2</u>		0,12	342(0,863) 288(0,787) 258(0,332) 213(1,651)	306(0,400) 262(0,329) 248(0,316)
<u>15</u>		0,12	348(0,831) 288(0,641) 257(0,330) 214(1,661)	305(0,266) 265(0,312) 243(0,293)
<u>16</u>		0,125	350(0,879) 289(0,642) 256(0,945) 214(1,777) 251(0,439)	306(0,255) 269(0,366) 253(0,438) 236(0,532)
<u>14</u> *		0,15	345(0,712) 291(0,656) 209(1,645)	308(0,330) 262(0,263)
<u>13</u>		Qual.	356(1,465) 288(1,164) 259(0,560) 212(2,400)	304(0,390) 265(0,556) 244(0,540)
<u>1</u>	0,1N HCl	0,12	331(0,693) 278(0,733) 205(1,157)	297(0,317) 249(0,193)
<u>2</u>		0,12	327(0,826) 281(0,860) 205(1,202)	299(0,541) 247(0,157)
<u>15</u>		(0,12)	329(0,736) 280(0,731) 205(1,082)	298(0,414) 250(0,000)
<u>16</u>		(0,125)	333(0,769) 280(0,732) 205(1,302)	298(0,422) 251(0,209)
<u>14</u>			331(0,660) 282(0,706) 204(1,050)	302(0,436) 250(0,124)

Tabelle 18: Fortsetzung

Substanz Nr.	LM	c mg in 5 ml LM	$\lambda_{max.}$ (nm) · (E)	$\lambda_{min.}$ (nm) · (E)
1		0,12	360(0,840) 280(0,310) 260(0,650) 218(1,026)	301(0,125) 274(0,300) 239(0,280)
2		0,12	353(0,833) 286(0,466) 260(0,542) 218(1,119)	305(0,219) 272(0,356) 242(0,402)
15	0,1N NaOH	0,12	359(0,855) 284(0,414) 257(0,730) 218(1,247)	303(0,198) 275(0,387) 241(0,494)
16		0,125	363(0,870) 282(0,372) [262(0,757)] 257(0,761) 218(1,215)	306(0,175) 276(0,360) 259(0,755) 241(0,481)
14 *		0,15	351(0,671) 286(0,500) 261(0,485) 218(1,108)	306(0,266) 273(0,412) 249(0,452)
Z_{12a}	H_2O		348(0,500) 286(0,437) 259(0,310) 214(1,382) [192(0,980)]	304(0,157) 266(0,296) 242(0,270)
"	0,1N HCl		332(0,454) 277(0,566) 204(1,180)	298(0,253) 249(0,241)
"	0,1N NaOH		362(0,471) [284(0,250)] 261(0,501) 217(1,415)	304(0,147) 273(0,280) 242(0,359)

*) 6-Methyl-7-oxo-8-(β-D-ribofuranosyl)-7,8-dihydrolumazin.
Freundlicherweise von Herrn Prof. W. Pfleiderer überlassen.

Gemäss den UV.-Daten der Hydrolyseprodukte besitzen die Verbindungen Z_{12a}, Zg, V_6 und V_7 der V-Compound (2) ähnliche Chromophorsysteme.

Die Dünnschichtchromatographie in verschiedenen Laufmitteln und die UV.-Daten zeigten, dass die Verbindungen Z_{12}, Zg und V_7 identisch sind und ihre R_f-Werte und Fluoreszenz denjenigen von 1 entsprechen (siehe Tabellen 13, 15-17).

Nach DC.-Cellulose; B/A/W 10:3:5, besteht die Zone V_6 aus 3 Substanzen. Die beiden Substanzen mit R_f-Werten 0,41 und 0,23 könnten der 2 (R_f 0,41) und 4 (R_f 0,23) und die dritte Substanz mit R_f-Wert 0,33 der 1 (R_f 0,32) entsprechen.

8. OZONOLYSE

Eine Lösung von 2 mg RP-s_{III} in 1 ml H_2O wurde mit 10 ml MeOH gemischt und bei - 75° ozonisiert (Ozonmenge 2,72 mg/Min.).

Farbumschlag von rot nach gelb in 2 Minuten. Hierauf wurde während 5 Min. ein starker N_2-Strom durch das System geleitet und anschliessend 2 ml Dimethylsulfid bei schwacher N_2-Zufuhr zugegeben. Danach wurde die Lösung bei - 10° eine Stunde, bei 0° eine weitere Stunde und schliesslich bei Z.T. nochmals eine Stunde gerührt. Langsamer Farbumschlag von gelb nach orange-rot.

Nach Abdampfen der Lösung zeigten DC-Cellulose mit 4proz. Natriumcitrat und B/A/W 5:3:5 die Bildung gelber und farbloser, blau fluoreszierender Produkte und das Vorhandensein von nicht reagierendem RP-s_{III}.

Die Wiederholung des gleichen Versuches bei 0° (Ozonisierungszeit 1 Min.) ergab, dass bei dieser Temperatur weitere Produkte entstehen, während immer noch nicht reagierendes RP-s_{III} vorhanden war.

Schlussfolgerung:
Bei dieser Reaktionsmischung (H_2O/MeOH 1:10) und tiefer Temperatur fällt ein Teil des RP-s_{III} aus, und eine vollständige Ozonisierung findet nicht statt (Löslichkeitsproblem von RP-s_{III} unter diesen Reaktionsbedingungen).

Versuche zur Lösung dieses Problems ergaben, dass RP-s_{III} im Verhältnis 1:4:10 (mg RP-s_{III}/ml H_2O/ml MeOH) bei - 70° genügend lange (9 Min.) in der Lösung bleibt.

So wurden analog zum ersten Versuch 2 mg RP-s_{III} in 8 ml H_2O und 20 ml MeOH bei - 70° in 4 Min. ozonisiert. Farbumschlag von rot nach gelb. Bei der weiteren Aufarbeitung blieb die Reaktionslösung gelb. Nach Abdampfen der Lösung zeigte das DC auf Cellulose mit B/A/W 5:3:5 die völlige Ozonisierung des RP-s_{III} und die optimale Bildung gelber und farbloser, blau fluoreszierender Produkte.

Bei der anschliessenden Chromatographie des Reaktionsgemisches mit Cellulose-Säule und H_2O liefen die blau fluoreszierenden Produkte zuerst, während eine gelbe Zone langsamer lief. Diese wurde mit 0,5proz. Pyridin eluiert (wegen der kleinen Menge waren weitere Versuche zur Trennung der gelben Produkte nicht möglich).

Vergleich der gelben Produkte aus $KMnO_4$-Oxydation und Ozonolyse siehe Tabelle 10.

9. $KMnO_4$-OXYDATION VON RP-s_{III}

9.1. Mikroversuch

Eine Lösung von 0,08 mg RP-s_{III} in 2,5 ml 0,5proz. AcOH wurde mit 0,0036proz. $KMnO_4$-Lösung oxydiert und die Reaktion durch Messung der UV/VIS.-Spektren kontrolliert (siehe Figur 16).

Wie diese Spektren zeigten, wurde RP-s_{III} durch Zugabe von 10 Tropfen $KMnO_4$-Lösung oxydiert, und es wurden dabei neue Produkte mit Maxima bei 425, 388, 267 und 220 nm gebildet. Die Probelösung wies eine gelbliche Farbe und Blaufluoreszenz auf.

Durch die weitere Zugabe von $KMnO_4$-Lösung wurden diese Produkte wieder zerstört.

9.2. Oxydation von 2 mg RP-s_{III}

Eine Lösung von 2 mg RP-s_{III} in 60 ml 0,5proz. AcOH wurde bei Z.T. während 20 Min. mit 10 ml 0,0036proz. $KMnO_4$-Lösung oxydiert. Das Reaktionsgemisch zeigte einen Farbumschlag von rot nach gelb. Die Lösung wurde abgedampft, in HV getrocknet und dann auf Cellulose-Säule mit H_2O chromatographiert. So liefen zuerst blau fluoreszierende Produkte, während eine gelbe Zone langsamer folgte. Die gelbe Zone wurde mit 1proz. Pyridin eluiert. DC auf CM-Cellulose mit einerseits 1proz. AcOH und anderseits 1proz. Pyridin (zweimal laufen gelassen) zeigten, dass die gelbe Zone aus 2 gelben Verbindungen besteht.

Papierelektrophorese der gelben Zone nach der Cellulose-Säule:

800 Volt, 4 mA, 1 Std.		
pH 2	(Essigsäure, H_2O Puffer)	5,8 cm kathodisch
600 Volt, 9-17 mA, 45 Min.		
pH 6,4	(KH_2PO_4, NaOH Puffer)	0,5 cm anodisch
600 Volt, 10-25 mA, 45 Min.		
pH 7,4	(KH_2PO_4, NaOH Puffer)	0,3 cm kathodisch

Danach wurde die gelbe Zone weiter mit CM-Cellulose-Säule (20x1cm) und mit 0,5proz. wässrigem Pyridin chromatographiert. Dabei konnte man 2 gelbe Zonen isolieren, die zuerst laufende $MnOxg_a$ und die nachfolgende $MnOxg_b$.

Die qualitativen, in Wasser gemessenen UV/VIS.-Spektren der zwei gelben Verbindungen zeigten folgende Maxima und Minima:

Subst.	$\lambda_{max.}$ (nm) · (E)
$MnOxg_a$	193(0,852), 228(0,350), 267(0,260) [360(0,270)], 422(0,492)
$MnOxg_b$	193(0,920), 230(0,480), 267(0,358) [367(0,430)], 424(0,700)
	$\lambda_{min.}$ (nm) · (E)
$MnOxg_a$	219(0,337), 255(0,243), 308(0,078)
$MnOxg_b$	216(0,426), 255(0,336), 308(0,099)

Die qualitative Ribose-Bestimmung war bei beiden Verbindungen positiv, und zwar erhielt man bei 668 nm eine Absorption $E = 0,385$ für $MnOxg_a$ und $E = 0,453$ für $MnOxg_b$.
Die gesamte Menge jeder Substanz reichte nur für die Messung des UV/VIS.-Spektrums.

9.3. Oxydation von 10 mg RP-s_{III}

Eine Lösung von 10 mg RP-s_{III} in 100 ml 0,5proz. AcOH wurde bei 0° während 20 Min. unter Rühren und langsamer Zugabe von 36,5 ml 0,0036proz. $KMnO_4$-Lösung oxydiert. Die Reaktionslösung zeigte einen Farbumschlag von rot nach gelb und eine gelb-blaue Fluoreszenz. Die saure Lösung wurde mit 2 ml Pyridin neutralisiert und abgedampft. Farbumschlag während des Abdampfens von gelb nach braun. Hierauf wurde das Reaktionsgemisch mit Cellulose-Säule chromatographiert, wobei zuerst mit H_2O blau fluoreszierende Produkte liefen, während eine gelbe Zone folgte. Auf der Säule blieb eine kleine Menge nicht oxydiertes RP-s_{III} haften. Die gelbe Zone wurde mit 1proz. Pyridin eluiert und hierauf mit CM-Cellulose-Säule und 0,5proz. Pyridin chromatographiert. So liessen sich 2 gelbe Zonen, die zuerst laufende $MnOxg_a$ und die nachfolgende $MnOxg_b$, unterscheiden.

Das blau fluoreszierende Wasser-Eluat der Cellulose-Säule wurde weiter an einer DEAE-Säule chromatographiert. Mit H_2O lief zunächst eine Hauptzone, während drei kleinere Zonen folgten. Die Hauptzone, die sog. $MnOx_1$, ist ein in Wasser schwer lösliches Produkt mit einer schwachen Fluoreszenz, während es nach Zugabe einer Spur Säure eine starke Blaufluoreszenz aufweist.

Das Produkt hat folgende R_f-Werte:
Cellulose; B/A/W 5:3:5 0,29 und CM-Cellulose; Wasser 0,30.

Daten der UV.-Spektren in verschiedenen pH-Bereichen zeigt die folgende Tabelle.

Lösungsmittel	λ_{max} (nm)·(E)
H_2O	191(1,198), 223(1,162), 266(0,616), 303(0,190), 385(1,24)
0,1 N HCl	210(1,08), 260(0,49), [293(0,26)], 317(0,308), 373(1,134)
0,1 N NaOH	218(1,168), [259(0,624)], 303(0,336), 375(0,98)
	λ_{min} (nm)·(E)
H_2O	207(1,00), 252(0,50), 287(0,170), 323(0,168)
0,1 N HCl	246(0,426), 281(0,24), 300(0,26), 323(0,294)
0,1 N NaOH	252(0,624), 283(0,316), 323(0,310)

Die qualitative Ribose-Bestimmung war positiv, mit einem Maximum bei 668 nm und E = 0,331.

Es handelt sich um die bei der späteren Oxydation von 100 mg RP-s_{III} isolierte Substanz $MnOx_3$.

Wegen der Annahme, dass bei der Oxydation eine Carbonsäure gebildet werden konnte, führte man einen Versuch zur Veresterung eines der gelben Produkte durch.

Veresterung:

Ein Teil von $MnOxg_a$ wurde in 5 ml absolutes Aethanol gebracht und danach bei Z.T. ein schwacher HCl-Gasstrom während 30 Min. durch die Lösung geleitet. Die schwach gelbliche Lösung wurde 2 Std. weitergerührt. DC-Cellulose/1proz. AcOH zeigte, dass die Substanz sich in verschiedene blau fluoreszierende Produkte zersetzte.

9.4. Oxydation von 100 mg RP-s_{III}

Insgesamt wurden 57 mg RP-s_{III} aus R.*sardonia* und 43 mg RP-s_{III} aus R.*emetica* oxydiert. Die Oxydation wurde wie folgt jeweils mit 25 mg RP-s_{III} viermal wiederholt:

25 mg RP-s_{III} wurden mit 150 ml 0,5proz. AcOH gelöst. Anschliessend wurde die Substanz bei 0^{o} unter Rühren mit 99,7 ml (Mittelwert) einer 0,0036proz. $KMnO_4$-Lösung während 20 Min. oxydiert. Die anfänglich rote Lösung färbte sich am Ende der Oxydation gelb. Die saure Lösung wurde mit 2 ml Pyridin neutralisiert und anschliessend abgedampft. Während des Abdampfens färbte sich die gelbe Lösung zuerst orangerot und schliesslich braun.

Analog wurden weitere 75 mg RP-s_{III} oxydiert. Von den vereinigten Oxydationsprodukten war nur ein Teil in Wasser löslich, der unlösliche Teil wurde durch Zentrifugieren abgetrennt.

Säulenchromatographie:

Der in Wasser leicht lösliche Teil wurde zuerst an Cellulose-Säule (31 x 2 cm) mit Wasser chromatographiert. So liefen die violett gefärbten, farblosen, blau fluoreszierenden und bräunlichen Reaktionsprodukte zuerst, während die gelb-orangefarbigen Produkte langsamer liefen. Ein kleiner Teil von nicht oxydiertem RP-s_{III} blieb zurück. Die gelb-orange Zone wurde mit 1proz. Pyridin eluiert. Anschliessend wurden die Reaktionsprodukte an einer CM-Cellulose-Säule chromatographiert. Zunächst eluierte man mit Wasser, wobei violette, orange-rote und farblose, blau fluoreszierende Zonen beobachtet wurden. Danach wurde mit 0,5proz. wässrigem Pyridin eluiert, dabei wanderte eine schwach gelbe Zone. Bei Eluieren

mit 5proz. Pyridin liefen schwach orange-rote und gelbe Zonen langsam. Die gelben Zonen wurden mit 10proz. Pyridin eluiert. Die zwei gelben Hauptprodukte wurden als $MnOxg_a$ und $MnOxg_b$ bezeichnet. $MnOxg_a$ lief an der CM-Cellulose-Säule schneller als die $MnOxg_b$. Die anschliessende Reinigung erfolgte durch nochmalige Chromatographie an der CM-Cellulose-Säule mit 0,5proz. wässrigen Pyridin.

9.5. Charakterisierung der zwei gelben Oxydationsprodukte

Die beiden gelben Substanzen sind in Wasser gut löslich, dagegen unlöslich in organischen Lösungsmitteln, selbst in DMSO, DMF und Pyridin. Sie sind in sauren und neutralen Lösungen und an der Luft unstabil, in basischen Lösungen dagegen etwas stabiler. Ihre Unstabilität erklärt die niedrige Ausbeute von 0,5 mg bei $MnOxg_a$ und 0,9 mg bei $MnOxg_b$ aus 100 mg $RP\text{-}s_{III}$.

R_f-Werte von $MnOxg_a$ und $MnOxg_b$

Substanz	Cellulose		CM-Cellulose	
	4proz. Nactr	B/A/W 10:3:5	1proz. AcOH	H_2O/Py 9:1
$MnOxg_a$	0,53	0,35	0,25	0,33
$MnOxg_b$	0,56	0,33	0,22	0,21

UV/VIS.-Spektren

$c = 0{,}17$ mg/5 ml H_2O

Substanz	$\lambda_{max.}$ (nm) · (E)
$MnOxg_a$	193(0,721), 232(0,619), 271(0,505), 422(1,280)
$MnOxg_b$	194(0,765), 232(0,615), 266(0,476), 424(1,038)
Substanz	**$\lambda_{min.}$ (nm) · (E)**
$MnOxg_a$	211(0,435), 253(0,437), 309(0,216)
$MnOxg_b$	211(0,418), 254(0,445), 305(0,157)

PFT-^{1}H-NMR.-Spektren

$MnOxg_a$ (c = 0,9 mg in 0,7 ml 99,96proz. D_2O)

3,5-3,86 ppm (M), 3,86-4,4 ppm (M), 4,4-4,8 ppm (M), 5,58 ppm (M), 7,5 ppm (M)

$MnOxg_b$ (c = 0,5 mg in 0,7 ml 99,96proz. D_2O)

3,4-3,96 ppm (M), 3,96-4,33 ppm (M), 4,33-4,9 ppm (M), 5,55 ppm (M), 7,5 ppm (M)

9.6. Isolierung der farblosen, blau fluoreszierenden Produkte

Das in Wasser schwer lösliche, farblose, blau fluoreszierende und, wie erwähnt, durch Zentrifugieren getrennte Produkt wurde an einer CM-Cellulose-Säule mit H_2O chromatographiert. Zu diesem Zweck wurden zwei Säulen (21 x 4 cm) benötigt. Das Produkt trennte sich in fünf nacheinander laufende, blau fluoreszierende Zonen, wovon $MnOx_3$, die dritte in der Reihe, die Hauptzone ist. Diese Zone wurde weiter an einer Sephadex G-25 Säule (55 x 5,5 cm) mit Wasser chromatographiert. So erhielt man 7 mg reine Substanz.

Qualitative UV.-Spektren der vier blau fluoreszierenden Zonen in H_2O.

Substanz	$\lambda_{max.}$ (nm)·(E)
$MnOx_1$	209(2,020), 265(1,107),[378(0,18)]
$MnOx_2$	213(2,055), 264(1,304),[383(0,045)]
$MnOx_4$	202,5(1,760),[219(1,420)] , 266(0,713), 376(0,751)
$MnOx_5$	198(1,526),[221(0,970)] ,[266(0,440)] , 389(0,359)
	$\lambda_{min.}$ (nm)·(E)
$MnOx_1$	242(0,693), 330(0,20)
$MnOx_2$	239(0,690), 334(0,10)
$MnOx_4$	255(0,637), 327(0,221)
$MnOx_5$	245(0,52) , 333(1,119)

R_f-Werte von $MnOx_3$

Fluoreszenz UV_{350nm} : blau

DC	H_2O/Py 9:1	B/A/W 5:3:5	B/A/W 10:3:5	4proz. Nactr
Cellulose	0,7	0,28	0,05	0,26
CM-Cellulose		0,27		0,35

Quantitative UV.-Absorptions-Spektren von $MnOx_3$

c = 0,1875 mg $MnOx_3$ in 5 ml Lösungsmittel.

Lösungs-mittel	λ_{max} (nm) · (E)
H_2O	226(1,518), 268(0,837), 305(0,253), 386(1,745)
0,1N HCl	216(1,258), 262(0,625), [294(0,328)], 319(0,418) 373(1,618)
0,1N NaOH	220(1,314), [262(0,687), 303(0,420)], 376(0,980)
	λ_{min} (nm) · (E)
H_2O	254(0,639), 287(0,203), 325(0,219)
0,1N HCl	249(0,510), 282(0,274), 300(0,317), 326(0,380)
0,1N NaOH	251(0,644), 283(0,360), 320(0,424)

Ribose-Bestimmung von $MnOx_3$

Für die Ribose-Bestimmung wurden 0,0375 mg $MnOx_3$ benötigt. Die Bestimmung ergab ein Absorptionsmaximum bei 668 nm mit E = 0,470. Dies entspricht 10,7 mg Ribose, woraus sich ein Aequivalentgewicht von 526 ergibt.

PFT-^{1}H-NMR.-Spektrum von $MnOx_3$

c = 7 mg Substanz in 1 ml d_6-DMSO

Signale bei:	D_2O-Austausch
11,80 ppm (D, J = 8 Hz)	verschwindet
10,50 ppm (S)	verschwindet
7,58 ppm (S)	bleibt
7,23 ppm (S)	verschwindet
5,60 ppm (D, J = 6 Hz)	bleibt
5,36 ppm (M), 5,08 ppm (M), 4,68 ppm (M)	verschwinden
4,38 ppm (M), 4,23 ppm (M), 4,01 ppm (M), 3,64 ppm (M)	bleiben
3,30 ppm HDO	
2,54 ppm d_5-DMSO	
2,10 ppm (S)	bleibt

10. UNTERSUCHUNG, OB DURCH DIE AcOH-DRUCKHYDROLYSE VON $MnOxg_a$, $MnOxg_b$ UND $MnOx_3$ DIE VERBINDUNGEN 1, 2 und 4 ENTSTEHEN.

Durchführung:

Je ca. 0,1 mg Substanz wurden in 0,2 ml 2N Essigsäure gelöst, im Pyrexbömbchen dreimal entgast und in Vakuum abgeschmolzen. Die Hydrolyse wurde während 1 3/4 Std. bei 150^{o} durchgeführt. Anschliessend erfolgte die DC-Untersuchung der Hydrolysate auf 1, 2 und 4.

Ergebnis:

Keine der drei genannten Verbindungen war nachweisbar.

11. UNTERSUCHUNG, OB NACH DER $KMnO_4$-OXYDATION VON $RP\text{-}s_{III}$ UND NACH DER AcOH-DRUCKHYDROLYSE DER OXYDATIONS-PRODUKTE V-COMPOUND (2) ENTSTEHT.

Eine Lösung von 1,1 mg $RP\text{-}s_{III}$ in 0,5proz. AcOH wurde bei 0^{o} mit 3,3 ml 0,0036proz. $KMnO_4$-Lösung während 10 Min. oxydiert. Nach der Neutralisation der Lösung mit 1 ml Pyridin wurde sie abgedampft und anschliessend an einer Cellulose-Säule zuerst mit H_2O und schliesslich mit 1proz. wässrigem Pyridin chromatographiert. So wurden die Oxydationsprodukte von dem nicht oxydierten $RP\text{-}s_{III}$ abgetrennt.

DC an Cellulose mit 4proz. Natriumcitrat der Oxydationsprodukte zeigt, dass durch die Oxydation keine V-Compound entsteht.

Weiter wurde ein Teil der Oxydationsprodukte in 0,5 ml 2N AcOH gelöst und im Bombenrohr unter Luftabschluss bei 150° während 1 3/4 Std. hydrolysiert. Unter gleichen Bedingungen wurden 0,4 mg RP-s_{III} hydrolysiert.

DC an Cellulose mit einerseits 4proz. Natriumcitrat und anderseits mit B/A/W 5:3:5 zeigen, dass die Entstehung von V-Compound aus der RP-s_{III}-Hydrolyse positiv sein könnte, während sie aus der Hydrolyse der Oxydationsprodukte negativ ist.

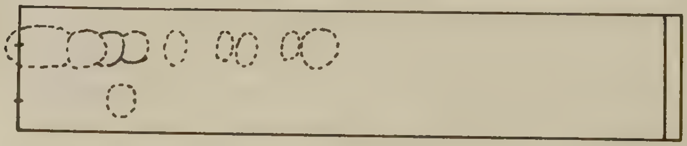
Diese Resultate führen zu der Ueberlegung, dass sich die V-Compound (2) möglicherweise während der $KMnO_4$-Oxydation zersetzt. Folgendes Experiment beweist diese Ueberlegung:

$KMnO_4$-Oxydation von (2)

Eine Lösung von 0,092 mg 2 in 2 ml 0,5proz. AcOH wurde bei Z.T. mit 0,0036proz. wässriger $KMnO_4$-Lösung oxydiert. Die Reaktion wurde mit DC an Cellulose mit 4proz. Natriumcitrat und B/A/W 10:3:5 kontrolliert. Nach 6 Std. und mit der Zugabe von insgesamt 3,5 ml 0,0036proz. wässriger $KMnO_4$-Lösung wurde 2 vollständig oxydiert. Ergebnisse siehe nachstehendes DC.

Ansatz

2



Cellulose B/A/W 10:3:5
Fluoreszenz UV_{350} blau

12. METALLKOMPLEXE VON RP-s_{III}

Probenherstellung

Für die Vorbereitung jeder Probe wurde RP-s_{III} mit dem entsprechenden Salz im Verhältnis 1:1 (je 1 mg RP-s_{III} in 1 ml H_2O mit den gegebenen Salzmengen) in Präparativgläsern (5 x 2,5 cm) gemischt. Nach einer Woche Stehenlassen bei Z.T. war das Wasser verdampft. Danach wurde jede Probe an Sephadex G-25 (12 x 3 cm) chromatographiert. Zunächst wurde sie mit 1/2 l H_2O ausgewaschen und hierauf mit 0,5proz. AcOH eluiert. Die erhaltene Probe wurde in 0,5 ml H_2O gelöst und mit Isopropanol-Diisopropylaether ausgefällt und abzentrifugiert. Nach Trocknen in HV folgte die qualitative Bestimmung jedes Metalls für die entsprechende Probe mit Hilfe der Atomabsorptionsspektrometrie.

Verwendete Menge und Art des Salzes (mg)	
0,440	$Zn(CH_3COO)_2$
0,425	$CuSO_4$
0,440	$Ca(NO_3)_2$
0,490	$NiSO_4$
0,610	$Pb(CH_3COO)_2$
0,540	$Cd(CH_3COO)_2$
0,690	$Cr(NO_3)_2$
0,550	$Hg(NO_3)_2$
0,490	$Al(NO_3)_2$
0,460	$Mn(CH_3COO)_2$
0,415	$AgNO_3$
0,395	$CoCl_2$
0,450	$FeCl_3$

Die Bestimmung war positiv für Zn, Cu, Ni, Ag und negativ für Cr und Fe. Die Hg-RP-s_{III}-Probe zersetzte sich.

Die Bestimmung von Pb, Ca, Cd, Al, Mn und Co konnte aus technischen Gründen nicht durchgeführt werden.

V LITERATURVERZEICHNIS

(1) E.F. Frauenfelder, Dissertation Universität Zürich 1970.

(2) P.X. Iten, Dissertation Universität Zürich 1973.

(3) H. Koch, E.F. Frauenfelder und C.H. Eugster, Helv. Chim. Acta 53, 131 (1970).

(4) P.X. Iten, S. Arihara und C.H. Eugster, Helv. Chim. Acta 56, 302 (1973).

(5) C.H. Eugster, Zeitschr. f. Pilzkunde, Karlsruhe, 39, 45 (1973).

(6) C.H. Eugster und P.X. Iten, "Chemistry and Biology of Pteridines", Walter de Gruyter, Berlin - New York 1976.

(7) H. Maerki-Danzig, P.X. Iten und C.H. Eugster, Publikation in Vorbereitung.

(8) H. Koch, Dissertation Universität Zürich 1975.

(9) H. Danzig, Diplomarbeit Universität Zürich 1976.

(10) H. Rieker, Diplomarbeit Universität Zürich 1970.

(11) M. Ja Zerova, G.L. Rozhenko, T.L. Cherer, Ukr. Bot. Zh. 33, 167 (1976).

(12) H. Romagnesi "Les Russules d'Europe et d'Afrique du Nord", Bordas, Paris 1967.

(13) P. Watson, Trans. brit. mycol. Soc. 49, 11 (1966).

(14) K. Gluchoff, Thèse, Université de Lyon 1969.

(15) K. Gluchoff und P. Lebreton, Compt. Rend. D 270, 213 (1970).

(16) J. Schaeffer "Die Russulae", Klinkhardt, Bad Heilbrunn 1952.

(17) G. Deysson, Bull. Soc. mycol. France 74, 207 (1958).

(18) K. Balenović, D. Cerar, Z. Pucar und V. Skaric, Arhiv za Kemiju 27, 15 (1955).

(19) J. Davoll und D.D. Evans, J. chem. Soc. 1960, 5041.

(20) T. Masuda, T. Kishi und M. Asai, Chem. Pharm. Bull. Japan 6, 291 (1958).

(21) P.B. Russell, R. Purrmann, W. Schmitt und G.H. Hitchings, J. Amer. chem. Soc. 71, 3412 (1949).

(22) H. Schlobach und W. Pfleiderer, Helv. Chim. Acta 55, 2518 (1972). K. Rokos und W. Pfeiderer, Chem. Ber. 108, 2728 (1975), Tetrahedron Letters 1977, 841.

(23) D.J. Brown und S.F. Mason, J. chem. Soc. 1956, 3443.

(24) S.F. Mason, J. chem. Soc. 1955, 2336.

(25) D.H. Williams und I. Fleming "Spektroskopische Methoden in der organischen Chemie", Georg Thieme Verlag, Stuttgart 1971.

(26) R.L. Pecsok und L.D. Shields "Modern Methods of Chemical Analysis", Wiley 1968.

(27) T. Kanzawa und T. Masuda, Chem. Pharm. Bull. Japan 4, 316 (1956).

(28) S.A. Barker und P. Stephens, J. chem. Soc. 1954, 4550.

(29) T. Ukita, A. Hamada und M. Yoshida, Chem. Pharm. Bull. Japan 12, 454 (1964).

(30) R.S. Tipson, J. org. Chem. 26, 2462 (1961).

(31) K. Onodera und S. Kitaoka, J. org. Chemistry 25, 1322 (1960).

(32) G. Scola-Nagelschneider und P. Hemmerich, Eur. J. Biochem. 66, 567 (1976).

(33) R.A. Stillings und B.L. Browing, Ind. Eng. Chemistry, Anal. Ed. 12, 499 (1940).

(34) (a) W. Mejbaum, Z. Physiol. Chem. 258, 117 (1939).
(b) S.E. Kerr und K. Seraidarian, J. biol. Chemistry 159, 211 (1945).
(c) M.S. Partridge, Biochem. J. 42, 238 (1948).
(d) Z. Dische, J. biol. Chemistry 181, 379 (1949).
(e) G. Geriotti, J. biol. Chemistry 214, 59 (1952).
(f) H. Ishihara, Anal. Biochem. 3, 186 (1962).
(g) M. Tomoda, Chem. Pharm. Bull. Japan 11, 809 (1963).
(h) A. Devi und U.Srivastava, Anal. Chem. 36, 882 (1964).
(i) E. McKay, Clin. Chim. Acta 10, 320 (1964).
(j) C.J. Rogers, Anal. Chem. 38, 1851 (1966).
(k) R.W. Scott, W.E. Moore, M.J. Effland und M.A. Millett, Anal. Biochem. 21, 68 (1967).

(l) W.F. Lehnhard und R.J. Winzler, J. Chromatogr. 34, 471 (1968).
(m) J. Mes und L. Kamm, J. Chromatogr. 43, 480 (1969).
(n) M. John, G. Trénel und H. Dellweg, J. Chromatogr. 42, 476 (1969).
(o) H. Schildknecht und R. Bühner, Z. Naturforsch. 24, 532 (1969).
(p) D.J. Bell und M.Q.-K. Talukder, J. Chromatogr. 49, 469 (1970).
(q) C. Szustkiewicz und J. Demetriou, Clin. Chim. Acta 32, 355 (1971).
(r) A. Floridi, J. Chromatogr. 59, 61 (1971).
(s) B.S. Mason und H.T. Slover, J. Agr. Food Chem. 19, 551 (1971).
(t) F. Champagnol und M. Bourzeix, J. Chromatogr. 59, 472 (1971).
(u) L. Messineo und J. d'Amico, Int. J. Biochem. 3, 351 (1972).
(v) K. Mopper und E.T. Degens, Anal. Biochem. 45, 147 (1972).
(w) G.V. Krasnova (USSR), Vses. Konf. Moladykh, Uch, Min. Ryb. Khozz SSSR (D.Kl) 1968, 335, CA 76 43559.
(x) N.E. Norden, O. Eriksson, B. Hultberg und P.A. Ockermann, Clin. Chim. Acta 44, 95 (1973).
(y) S. Morgenlie, Carbohydr. Res. 41, 285 (1975).
(z) J. Stadtler, Anal. Biochem. 74, 62 (1976).

(35) (a) J. Hanusova, Cesk. Hyg. 21, 463 (1976). CA 86, 176968.
(b) Z. Dische und K. Schwarz, Mikrochim. Acta 2, 13 (1937).

(36) M. Bial, Dtsch. Med. Wscher 28, 253 (1902).

(37) Z.J. Vejdélek und B. Kakáč "Farbreaktionen in der spektrophotometrischen Analyse org. Verbindungen", Band I, VEB Gustav Fischer, Jena 1969.

(38) H.F. Drury, Arch. Biochem. 19, 455 (1948).

(39) M.L. Morse und C.E. Carter, J. Bact. 58, 317 (1949).

(40) M. Ikawa und C. Niemann, Arch. Biochem. Bioph. 31, 62 (1951).

(41) P. Byvoet, Anal. Biochem. 15, 31 (1966).

(42) P. Karrer, B.R. Nicolaus und R. Schwyzer, Helv. Chim. Acta 33, 1233 (1950).

(43) J.J. Pappas und W.P. Keaveney, Tetrahedron Letters 1966, 4273.

(44) A. Albert und E.P. Sergeant, J. chem. Soc. 1964, 3357.

(45) M. Goto, K. Kobayashi, H. Sato und F. Korte, Liebigs Ann. Chem. 689, 221 (1965).

(46) M. Viscontini und M. Piraux, Helv. Chim. Acta 46, 1537 (1963).

(47) M. Viscontini und R. Bühler-Moor, Helv. Chim. Acta 51, 1548 (1968).

(48) A. Albert und W.L.F. Armarego "Advances in heterocyclic Chemistry", Vol. 4, A.R. Katritzky Academic Press 1965.

(49) N.W. Jacobsen, J. chem. Soc. 1966, 1065.

(50) H. Schmid, M. Schranner und W. Pfleiderer, Chem. Ber. 106, 1952 (1973).

(51) M. Ott und W. Pfleiderer, Chem. Ber. 107, 353 (1974).

(52) W. Pfleiderer, Chem. Ber. 90, 2617 (1957).

(53) U. Ewers, H. Günther und L. Jaenicke, Chem. Ber. 107, 3275 (1974).

(54) G. Müller und W. von Philipsborn, Helv. Chim. Acta 56, 2680 (1973).

(55) E. Breitmaier, J. Günther und W. Voelter, Chimia 26, 136 (1972).

(56) E. Wenkert und E.W. Hagaman, Biochem. Bioph. Res. Commn. 51, 318 (1973).

(57) N. Yamaoka, T. Usui, H. Sugiyama und S. Seto, Chem. Pharm. Bull. Japan 22, 2198 (1974).

(58) A.J. Jones, D.M. Grant, M.W. Winkley und R.K. Robins, J. Phys. Chem. 74, 2684 (1970).

(59) H. Sugiyama, N. Yamaoka, B. Shimizu, Y. Ishido und S. Seto, Bull. Chem. Soc. Japan 47, 1815 (1974).

(60) A.J. Jones, D.M. Grant, M.W. Winkley und R.K. Robins, J. Amer. chem. Soc. 92, 4079 (1970).

(61) A. Alberts, Quarterly Review 6, 197 (1952).

(62) I. Baarda und D. Metzler, Biochem. Biophys. Acta 50, 463 (1961).

(63) T. Roberie, N.S. Bhacca und J. Selbin, Can. J. Chem. 55, 575 (1977).

(64) W. Voelter, G. Jung, E. Breitmaier und R. Price, Hoppe-Seyler's Z. Physiol. Chem. 352, 1034 (1971).

CURRICULUM VITAE

Am 16. März 1947 wurde ich, Thomas J. Venakis, als Sohn von Josef und Vasiliki Venakis-Papadaki in Zouridion, Provinz Rethymnon/Kreta, Griechenland, geboren.

Dort besuchte ich 6 Jahre die Primarschule, anschliessend in Rethymnon 3 Jahre das Gymnasium sowie 2 Jahre das Naturwissenschaftliche Gymnasium und ein weiteres Jahr das Naturwissenschaftliche Gymnasium in Athen, wo ich 1965 die Matura erlangte.

Im Wintersemester 1966 begann ich mein Studium an der Naturwissenschaftlichen Fakultät der Universität Patras (Griechenland) mit Hauptfach Chemie und schloss im Juni 1971 mit dem Diplom ab.

Im Januar 1975 erhielt ich eine Nationalfonds-Assistentenstelle am Organisch-chemischen Institut der Universität Zürich und begann an diesem Institut meine Doktorarbeit unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. C.H. Eugster. Den experimentellen Teil der Dissertation schloss ich im Oktober 1977 ab.

Gleichzeitig besuchte ich Vorlesungen bei den Professoren: C.H. Eugster, K. Bernauer, A. Dreiding, M. Hesse, W. von Philipsborn und M. Viscontini.